



Otimização das condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 para produção de lípidos e carotenóides, em frascos agitados

Corália Isabel Sepúlveda e Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar

Especialização em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Doutora Teresa Lopes da Silva

Coorientador: Professora Doutora Luísa Louro

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Alberto José Delgado Reis, Investigador Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia

Doutora Maria Teresa Saraiva Lopes da Silva, Investigadora Auxiliar do Laboratório Nacional de Energia e Geologia

Agradecimentos

À minha família pelo amor e incentivo.

À Doutora Teresa Lopes da Silva por toda a orientação que me deu e prontidão em atender às minhas dúvidas enquanto estava a executar o meu trabalho laboratorial, pela ajuda, compreensão e simpatia.

À professora Luísa Louro por todo apoio, simpatia e compreensão.

À Carla Dias e Cláudia Freitas por me terem guiado no meu trabalho laboratorial, pela disponibilidade em atender às minhas dúvidas e pela amizade.

À D. Céu Penedo pela disponibilidade em ajudar-me no meu trabalho laboratorial e pela compreensão.

À Doutora Margarida Monteiro por toda a sua disponibilidade em atender às minhas dúvidas, pelos conhecimentos que me fez adquirir na área da microbiologia e pela simpatia.

À Doutora Carla Santos e Engenheiro Carlos Barata pela ajuda e conselhos.

Aos colegas do LNEG pela companhia nos momentos de descontração.

Ao laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG) por me ter acolhido na sua instituição para poder realizar a minha tese de mestrado.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Factores de Competitividade- COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT-Fundação para a Ciência e a Tecnologia, âmbito do projecto CAROFUEL PTDC/AAC-AMB/116534/2010 “NOVO PROCESSO DE PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE BIODIESEL: A BIOREFINARIA DA LEVEDURA RHODOTORULA GLUTINIS COMO FONTE DE BIODIESEL, BIOGÁS E CAROTENÓIDES”.

Resumo

A produção microbiana de lípidos e carotenóides é influenciada pelas condições experimentais de cultivo, tais como o pH inicial do meio, a temperatura e a agitação. Neste trabalho estudou-se a influência do pH, temperatura e agitação na produção de ácidos gordos e carotenóides pela levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921, cultivada em frascos agitados. A máxima produção de carotenóides ($3,66 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) ocorreu a pH 4,5, temperatura 30°C e agitação 150 rpm. A máxima produção de ácidos gordos foi obtida a pH 4,0 ($0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), à temperatura de 30°C ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e a agitação 120 rpm ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A otimização das condições de cultivo possibilitou produzir biodiesel e carotenóides de forma mais rentável.

Palavras-Chave: *Rhodosporidium toruloides*, condições de cultivo, carotenóides, ácidos gordos.

Abstract

The microbial production of lipids and carotenoids is influenced by the experimental culture conditions, such as the initial pH of the medium, the temperature and the agitation. In this work we study the influence of pH, temperature and agitation on the production of fatty acids and carotenoids by the yeast *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921, cultivated in shake flasks. The maximum production of carotenoids ($3,66 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) occurred at pH 4,5; temperature 30°C and 150 rpm agitation. The maximum production of fatty acids was obtained at pH 4,0 ($0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), at a temperature of 30°C ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and 120 rpm agitation ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). The optimization of culture conditions allowed for producing biodiesel and carotenoids more profitably.

Key-Words: *Rhodosporidium toruloides*, culture conditions, carotenoids, fatty acids.

Extended Abstract

Biodiesel consists of methyl or ethyl esters of fatty acids as emerged as a need to replace fossil fuels responsible for negative environmental impacts. Fatty acids for biodiesel production can be obtained from raw materials of first generation (crops). However, there is a competition between the use of these cultures to produce biodiesel or for food production. Emerged as an alternative raw materials of third-generation (microorganisms), oleaginous yeasts produce intracellularly oil over 20% of its dry weight and are termed as single cell oil (SCO). Some of them also produce high added value products (such as carotenoids) that, when produced simultaneously, may contribute to reduce the cost of biodiesel.

The production of these products (fatty acids and carotenoids) by yeast is species dependent, and is influenced by the growth conditions. In order to study the effect of the culture conditions on the production of these products by the yeast *Rhodospiridium toruloides*, three parameters were studied: pH, temperature and agitation.

The effect of the initial medium pH on the growth and production of carotenoids and lipids by the yeast *Rhodospiridium toruloides* was studied. The maximum specific growth rate ($0,11 \text{ h}^{-1}$) was observed for the experiment conducted at pH 4,0. The maximum carotenoids productivity ($3,66 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was observed for the experiment conducted at pH 4,5, and the highest fatty acid productivity ($0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was found at pH 4,0.

Concerning the effect of the temperature on the lipid and carotenoid production by the yeast, the maximum specific growth rate ($0,09 \text{ h}^{-1}$) was found at 30°C , as well as the, maximum carotenoids productivity ($3,66 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and the highest fatty acid productivity ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). The temperature also influenced the fatty acid composition decreasing the proportion of unsaturated fatty acids with increasing temperature.

Higher stirring rates increases the dissolved oxygen in the growth medium. At 120 rpm the specific growth rate was maximum ($0,10 \text{ h}^{-1}$). The highest carotenoids productivity ($3,66 \mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was obtained at 150 rpm. The highest fatty acids productivity ($0,01 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was obtained at 120 rpm.

The optimization of culture conditions allows to obtain higher yields of lipids and carotenoids which is important when we want to make the most profitable and competitive biodiesel with fossil fuels.

Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo/Abstract.....	IV
Extended Abstract.....	V
Índice.....	VI
Lista de Abreviaturas.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Equações.....	X
Lista de Tabelas.....	XI
INTRODUÇÃO.....	1
1. Combustíveis fósseis versus Biodiesel.....	1
2. Matérias-primas para produção de biodiesel.....	1
3. Caracterização de <i>Rhodosporidium toruloides</i>	4
4. Curva de crescimento do microrganismo.....	4
5. Lípidos.....	5
6. Carotenóides.....	5
7. Condições de cultivo para a produção de ácidos gordos pelas leveduras.....	6
8. Condições de cultivo para a produção de carotenóides pelas leveduras.....	8
OBJETIVOS.....	10
MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
1. Microrganismo em estudo.....	11
2. Crescimento do microrganismo.....	11
3. Doseamento de Açúcares Redutores – Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS).....	12
4. Transesterificação.....	13
5. Determinação de Azotos.....	14
6. Citometria de fluxo na deteção de carotenóides.....	14
7. Cálculos.....	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
1. Estudo do pH inicial do meio de cultura no crescimento e produção de lípidos (ácidos gordos) e carotenóides totais da levedura <i>R. toruloides</i> NCYC 921.....	20
1.1. Efeito do pH inicial no crescimento de <i>R. toruloides</i>	20
1.2. Efeito do pH inicial na produção de carotenóides.....	26
1.3. Efeito do pH inicial na produção de ácidos gordos.....	27
1.3.1. Efeito do pH inicial na composição dos ácidos gordos.....	28

2. Efeito da temperatura no crescimento e produção de carotenóides e ácidos gordos pela levedura <i>R. toruloides</i> NCYC 921.....	30
2.1. Efeito da temperatura no crescimento de <i>R. toruloides</i>	30
2.2. Efeito da temperatura na produção de carotenóides.....	35
2.3. Efeito da temperatura na produção de ácidos gordos.....	36
2.3.1. Efeito da temperatura na composição dos ácidos gordos.....	37
3. Efeito da agitação no crescimento e produção de carotenóides e ácidos gordos pela levedura <i>R. toruloides</i> NCYC 921.....	38
3.1. Efeito da agitação no crescimento de <i>R. toruloides</i>	38
3.2. Efeito da agitação na produção de carotenóides.....	44
3.3. Efeito da agitação na produção de ácidos gordos.....	44
3.3.1. Efeito da agitação na composição dos ácidos gordos.....	45
CONCLUSÃO	48
BIBLIOGRAFIA	49
ANEXO I	53

Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Designação
μ	Taxa específica de crescimento
AF	Autofluorescência
FL	Detector a fluorescência do citómetro
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
SCO	Single cell oil
v/v	Porção em volume
AGT	Ácidos gordos totais
CT	Carotenóides totais
C/N	Razão carbono/azoto
DCW	Dry cell weight
D.O.	Densidade óptica
rpm	Rotações por minuto
k_La	Coeficiente de transferência de oxigénio
r_s	Taxa volumétrica de consumo de glucose
S_i	Concentração de glucose inicial
S_f	Concentração de glucose final
$Y_{x/s}$	Rendimento de biomassa em relação à fonte de carbono
X_i	Concentração de biomassa inicial
X_f	Concentração de biomassa final
Δt	Intervalo de tempo
P_x	Produtividade volumétrica da biomassa
FR	Factor de Resposta do ácido gordo
$Y_{AGT/S}$	Rendimento de ácidos gordos totais em relação á fonte de carbono
P_{AGT}	Produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais
C_{AGT}	Concentração de ácidos gordos totais
C_{CT}	Concentração de carotenoides totais
$Y_{CT/S}$	Rendimento de carotenoides totais em relação á fonte de carbono
P_{CT}	Produtividade volumétrica dos carotenoides totais
N_i	Concentração de azoto inicial
N_f	Concentração de azoto final
r_N	Taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto
$Y_{x/N}$	Rendimento de biomassa em relação á fonte de azoto

Lista da Figuras

Figura 1. Reação de transesterificação para produção de ésteres alquílicos (biodiesel).

Figura 2. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* em frascos agitados.

Figura 3. Gráfico Ln Biomassa *versus* tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides*.

Figura 4. Variação do pH ao longo do tempo para cada pH.

Figura 5. Concentração da glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para os ensaios realizados a diferentes pHs.

Figura 6. Evolução da concentração de Azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada pH.

Figura 7. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* para cada temperatura, em frascos agitados.

Figura 8. Gráfico Ln Biomassa *versus* tempo (h) referente ao crescimento de *R. toruloides* para cada temperatura.

Figura 9. Variação do pH em função do tempo para cada temperatura.

Figura 10. Concentração da glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para cada temperatura.

Figura 11. Evolução da concentração de azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada temperatura.

Figura 12. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* para cada agitação, em frascos agitados.

Figura 13. Curvas de crescimento de *R. toruloides* a 120, 150 e 180 rpm.

Figura 14. Variação do pH em função do tempo para cada agitação.

Figura 15. Concentração de glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para cada agitação.

Figura 16. Evolução da concentração de azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada agitação.

Lista de equações

Equação 1. Teor total de carotenóides (citómetro de fluxo).

Equação 2. Concentração da biomassa.

Equação 3. Taxa específica de crescimento.

Equação 4. Taxa volumétrica de consumo de glucose.

Equação 5. Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono.

Equação 6. Produtividade volumétrica da biomassa.

Equação 7. Massa do ácido gordo.

Equação 8. Percentagem mássica de cada ácido gordo.

Equação 9. Percentagem de ácidos gordos totais em relação à biomassa.

Equação 10. Concentração de ácidos gordos totais.

Equação 11. Rendimento dos ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono.

Equação 12. Produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais.

Equação 13. Concentração dos carotenóides totais.

Equação 14. Rendimento dos carotenóides totais em relação à fonte de carbono.

Equação 15. Produtividade volumétrica dos carotenóides totais.

Equação 16. Teor de azoto (%).

Equação 17. Concentração de azoto.

Equação 18. Taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto.

Equação 19. Rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Taxa específica de crescimento (μ), concentração da biomassa máxima (X_{\max}) e produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para cada pH.

Tabela 2. Consumo de glucose, rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{X/S}$) e taxa volumétrica de consumo da fonte de glucose (r_s).

Tabela 3. Consumo de azoto, rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada pH.

Tabela 4. Efeito do pH inicial na produção de carotenóides pela levedura *R. toruloides*.

Tabela 5. Efeito do pH inicial na produção de ácidos gordos pela levedura *R. toruloides*.

Tabela 6. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para os pHs 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0.

Tabela 7. Taxa específica de crescimento (μ), concentração de biomassa máxima (X_{\max}) e Produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para as temperaturas de 27°C, 30°C e 33°C.

Tabela 8. Consumo de glucose, rendimento de biomassa em relação á fonte de carbono ($Y_{X/S}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de carbono (r_s) para cada temperatura.

Tabela 9. Consumo de azoto, rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada temperatura.

Tabela 10. Efeito da temperatura na produção de carotenóides a pH 4,5, 150rpm.

Tabela 11. Efeito da temperatura na produção de ácidos gordos a pH 4,5, 150rpm.

Tabela 12. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para as temperaturas 27°C, 30°C e 33°C.

Tabela 13. Taxa específica de crescimento (μ), concentração de biomassa máxima (X_{\max}) e Produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para a velocidade de agitação de 120, 150 e 180rpm.

Tabela 14. Consumo de glucose, rendimento de biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{X/S}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose (r_s) para cada agitação.

Tabela 15. Consumo de azoto, rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada agitação.

Tabela 16. Influência da velocidade de agitação (rpm) na produção de carotenóides de *R. toruloides* a pH 4,5, 30°C.

Tabela 17. Influência da velocidade de agitação (rpm) na produção de ácidos gordos de *R. toruloides* a pH 4,5, 30°C.

Tabela 18. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para as agitações de 120rpm, 150rpm e 180rpm.

Tabela 19. Lista de Reagentes.

INTRODUÇÃO

1. Combustíveis fósseis *versus* Biodiesel

Os combustíveis fósseis são uma fonte de energia não renovável cujo consumo elevado observado nos últimos anos levará ao seu esgotamento num futuro próximo. Acresce que a utilização dos combustíveis fósseis, designadamente, no sector dos transportes contribui significativamente para a emissão de dióxido de carbono e de outros gases com efeito de estufa para a atmosfera. Como meio de ultrapassar estes inconvenientes, têm sido desenvolvidas fontes de energia alternativas, designadamente energias renováveis como o biodiesel (Bagy *et al.* (2014)).

Algumas plantas e microrganismos contêm óleos na forma de triglicéridos. Estes podem ser transformados em biodiesel através de uma reação de transesterificação (em presença de metanol ou etanol e de um catalisador) (Salvi & Panwar (2012)) sendo este constituído por ésteres metílicos ou etílicos de ácidos gordos (figura 1).

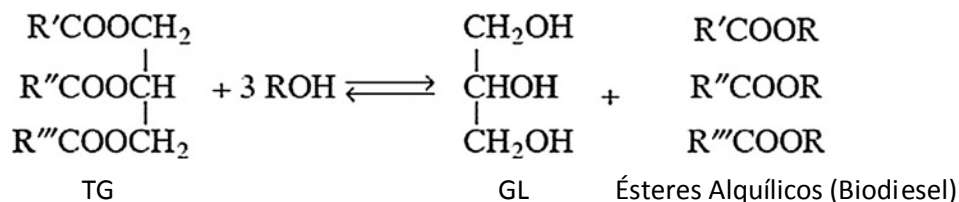


Figura 1. Reação de transesterificação para produção de ésteres alquílicos (biodiesel). (Adaptado de Salvi & Panwar (2012)).

2. Matérias-primas para produção de biodiesel

Atualmente, várias são as matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel. Este é um fator importante pois determina a rentabilidade do biodiesel. Entre a biomassa renovável utilizada para produzir biodiesel referem-se as matérias-primas de primeira-geração (provenientes das culturas agrícolas), de segunda-geração (biomassa lignocelulósica) e de terceira-geração (microrganismos) (Srirangan *et al.* (2012)). A utilização da biomassa de primeira-geração para produção de biodiesel exige vastas áreas de solos agrícolas, e um clima favorável ao cultivo dessas culturas. O Brasil possui regiões que reúnem estas condições, sendo o maior produtor mundial de soja e de outras culturas como

o óleo de palma, pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), coco, babaçu, girassol, colza, mamona, amendoim e algodão. Segundo Bergmann *et al.* (2013), o teor em óleo varia de espécie para espécie e, dentro da espécie, varia segundo a parte da planta em que é extraído.

Outra alternativa às culturas agrícolas consiste na utilização de matéria-prima obtida a partir da biomassa lignocelulósica para produção de biodiesel. Esta biomassa pode ser obtida numa grande variedade de climas e solos mas, devido á complexidade dos seus constituintes ricos em polissacáridos (celulose e hemicelulose) o processo da sua conversão em monossacáridos (substratos que podem ser transformados em biocombustíveis) torna-se complexo sendo, neste momento, ainda economicamente insustentável (Srirangan *et al.* (2012)).

Os microrganismos oleaginosos surgem como uma alternativa às matérias-primas de primeira e segunda geração, visto que têm um ciclo de vida curto, o seu cultivo requer menos mão-de-obra, e não é dependente de fatores climáticos (Li *et al.* (2008)).

As microalgas oleaginosas, por conterem óleo que pode ser transformado em biodiesel, têm sido alvo de investigação pela comunidade científica (Rawat *et al.* (2013)). Elas podem desenvolver-se auto ou heterotroficamente. As autotróficas utilizam dióxido de carbono como fonte de carbono e a luz solar como fonte de energia para acumularem óleo, sob determinadas condições; as heterotróficas utilizam fontes de carbono orgânico para produzir lípidos em vez da energia solar, podendo ser cultivadas em reatores convencionais (Li *et al.* (2008)). Do total de lípidos acumulados pelas microalgas, mais de 80% são triglicéridos, sendo ricas em ácidos gordos $\omega 3$ e $\omega 6$ (Meng *et al.* (2009)).

Comparativamente às culturas agrícolas, as microalgas oleaginosas são mais rentáveis em termos de produção de óleo. O seu sistema fotossintético é mais eficiente do que o das plantas, e apresentam maiores taxas de crescimento, conseguindo acumular mais rapidamente grandes quantidades de lípidos. Estes microrganismos chegam a duplicar-se múltiplas vezes por dia, embora, o normal seja duplicarem ao fim de 24h. Utilizam menores quantidades de água do que as culturas terrestres, não havendo necessidade de aplicação de pesticidas e herbicidas, reduzindo assim os impactos ambientais negativos que as culturas terrestres apresentam. As microalgas também têm a capacidade de produzir produtos de alto valor acrescentado, como os carotenóides, para uso comercial e farmacêutico (Rawat *et al.* (2013)).

Microorganismos como as leveduras têm a capacidade de sintetizar lípidos que, tal como as microalgas, podem ser transformados em biodiesel (Heeres *et al.* (2014)). *Rhodosporidium toruloides* é uma levedura oleaginosa capaz de produzir lípidos num teor acima de 20% do seu peso seco. A acumulação de lípidos ocorre quando um nutriente, que não seja o carbono, limita o crescimento do microrganismo. Nessas condições, o excesso de carbono assimilado pela célula é utilizado na síntese de lípidos, geralmente, triglicéridos, que acumulam intracelularmente (Rossi *et al.*). Os ácidos gordos maioritários que compõem os lípidos desta levedura geralmente são o ácido oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) (Fei *et al.* (2011); Li *et al.* (2008)).

Comparativamente com as microalgas, as leveduras apresentam maior produtividade quer em biomassa, quer em teor lipídico (Freitas *et al.* (2014)). Embora as microalgas autotróficas captem o dióxido de carbono da atmosfera, contribuindo para reduzir os gases de efeito de estufa, o seu cultivo depende do clima e estação do ano, pois as microalgas necessitam da radiação solar para se desenvolverem, tal como acima referido (Li *et al.* (2008) e Freitas *et al.* (2014)). Outro inconveniente associado à utilização de microalgas relaciona-se com possíveis contaminações por protozoários e zooplâncton quando são cultivadas em lagoas ao ar livre, o sistema de cultivo mais económico, mas mais suscetível de contaminar. Pelo contrário, as leveduras são cultivadas em reatores convencionais, sob condições operacionais estritamente controladas, o que reduz a probabilidade de ocorrerem contaminações. Por outro lado, o seu cultivo não depende do clima ou estação do ano, o que as torna ideais para serem cultivadas em regiões do planeta com pouca radiação solar (Freitas *et al.* (2014)).

No entanto, a obtenção de biodiesel a partir de microrganismos, apesar de apresentar benefícios ambientais em relação aos combustíveis fósseis, ainda não é economicamente sustentável porque o preço do biodiesel obtido por esta via é mais caro do que o preço de mercado do diesel convencional. Neste contexto, torna-se necessário procurar abordagens que diminuam os custos de produção dos combustíveis obtidos por via microbiana. Na maioria dos estudos publicados sobre a produção de biodiesel a partir de microrganismos, a biomassa microbiana é utilizada na totalidade para extração de lípidos que posteriormente são transformados em biodiesel (Xue *et al.* (2006), Karatay & Dönmez (2010) e Fei *et al.* (2011)), não havendo qualquer aproveitamento da biomassa que resta após a extração de lípidos. Uma forma de rentabilizar este processo consiste na obtenção de outros produtos da biomassa (proteínas, hidratos de carbono, pigmentos), de forma a

valorizar várias frações desta, o que poderá tornar economicamente rentável a produção de biodiesel por via microbiana (Lopes da Silva *et al.* (2013)).

3. Caracterização de *Rhodosporidium toruloides*

Neste trabalho utilizou-se a levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 por apresentar teores elevados de lípidos (> 20% p/p) e produzir carotenóides com interesse comercial para as indústrias alimentar e farmacêutica. A levedura *Rhodosporidium toruloides* é uma levedura oleaginosa, cujas colónias apresentam uma cor vermelho-alaranjada devido à presença de carotenóides, maioritariamente β -caroteno, toruleno e torularrudina (Andrade (2010) e Yoon & Rhee (1983)).

Do ponto de vista taxonómico, esta levedura pode classificar-se como pertencendo ao Reino *Fungi*, Filo *Basidiomycota*, Classe *Ustomycetes*, Ordem *Sporidiobolales*, Família *Sporidiobolaceae*, Género *Rhodotorula* e Espécie *Rhodosporidium toruloides* (Januário (2014)). A espécie *Rhodosporidium toruloides* é o estado sexuado de *Rhodotorula glutinis*.

Esta levedura apresenta-se sob a forma de esferas com alguns micrómetros de comprimento e divide-se por brotamento. O brotamento consiste em uma célula mãe dar origem a uma célula filha de diâmetro mais pequeno através da formação de um broto na superfície até se desconectarem. Quando as condições ambientais são adversas, esta levedura também pode transitar para pseudo-hifa (transição dimórfica) que é um alongamento formado por novas células por brotamento. Um facto notável é que a levedura apresenta vários núcleos num citoplasma o que requer a formação de um septo (Knop (2011)).

4. Curva de crescimento do microrganismo

No crescimento de uma levedura cultivada em regime descontínuo, destacam-se três fases: a fase de latência, a fase exponencial e a fase estacionária. A fase de latência é aquela em que não há crescimento celular significativo porque as células estão ainda a adaptar-se ao meio e às condições de cultivo. Na fase exponencial, todos os nutrientes estão em excesso, o que permite que as células se multipliquem a uma taxa constante. Na fase estacionária, as células deixam de se multiplicar devido ao esgotamento de um nutriente, ou por acumulação de metabolitos inibidores do crescimento. Na fase exponencial e na fase estacionária produzem-se metabolitos como os lípidos e os carotenóides de que a

célula necessita para o seu crescimento e manutenção (Adams & Moss (1995) e Stanbury & Whitaker (1984)).

5. Lípidos

Os lípidos podem ser encontrados não só em organismos vegetais e animais, mas também em microrganismos. Estes compostos podem enquadrar-se em duas frações: a saponificável, que contém principalmente os mono, di e triglicéridos, cuja hidrólise resulta na formação de ácidos gordos e glicerol, e a insaponificável constituída pelos carotenóides, esteróis, álcoois e hidrocarbonetos (Ribeiro & Seratalli (2007)). Apenas a fração saponificável é convertível em ésteres metílicos (ou etílicos) que compõem o biodiesel.

Os monoglicéridos são compostos que contêm uma única molécula de ácido gordo ligada ao glicerol, os diglicéridos contêm duas moléculas de ácidos gordos ligadas ao glicerol e os triglicéridos contêm três moléculas de ácidos gordos ligadas ao glicerol. Os ácidos gordos podem apresentar-se sob diversas combinações, ou seja, os triglicéridos podem conter diferentes ácidos gordos ou até os mesmos (Ribeiro & Seratalli (2007) e Karleskind (1992)).

6. Carotenóides

Os carotenóides são pigmentos naturais que são produzidos por microrganismos (bactérias, algas, fungos e leveduras) e por plantas. Estes compostos são tetraterpenos constituídos por 40 átomos de carbono. A parte central da molécula contém um sistema alternado de ligações duplas e simples. São estas ligações duplas conjugadas que conferem aos pigmentos a sua cor que, dependendo da absorção, varia de amarelo a vermelho. A importância destes pigmentos é devido ao facto de serem precursores de vitamina A, além de possuírem propriedades antitumorais, de combaterem cataratas, e as doenças cardiovasculares. Para além de serem usadas para efeitos farmacêuticos, também podem ser usadas na indústria alimentar como aditivos (Frengova & Beshkova (2009) e Yahia & Ornela-Paz).

7. Condições de cultivo para a produção de ácidos gordos pelas leveduras

A temperatura, o pH e a agitação (que condiciona a disponibilidade de oxigénio no meio de cultura), condições operacionais do cultivo de microrganismos, influenciam o teor e composição de lípidos microbianos (Meng *et al.* (2009)).

7.1. pH inicial do meio

O pH também é um fator determinante na acumulação de lípidos pelas leveduras (Donot *et al.* (2014)).

Xue *et al.* (2006) investigaram a influência do pH no crescimento e produção de lípidos pela levedura *R. glutinis* cultivada em meio contendo efluente de glutamato de sódio, à temperatura de 30°C, agitação de 140 rpm. Verificaram que a máxima concentração de biomassa (aproximadamente 4,8 g/L) e o máximo teor lipídico (aproximadamente 10% p/p em relação à biomassa) se obtinha a pH 5,5.

Karatay & Dönmez (2010) estudaram o efeito do pH inicial do meio na produção lipídica de várias espécies de leveduras, entre as quais *R. mucilaginosa*, desenvolvidas num meio que continha melaço de cana-de-açúcar e incubado a 30°C e a 100 rpm, variando o pH do meio de 4 a 7. O máximo teor lipídico para *R. mucilaginosa* foi de 69,5% p/p em relação à biomassa a pH 5,0.

Verifica-se assim que o pH ótimo para o crescimento e a produção de ácidos gordos, é o mesmo, dependendo da estirpe utilizada. Efetivamente, os ácidos gordos são metabolitos primários, ou seja, estão associados ao crescimento da levedura (Freitas *et al.* (2014)).

7.2. Temperatura

A temperatura também influencia a produção de lípidos microbianos, bem como a composição dos mesmos. Saxena *et al.* (1998) estudaram o comportamento de *Rhodotorula minuta* a diferentes temperaturas em fermentador entre 30°C e 38°C. No final da fase de acumulação de lípidos a 32°C obtiveram a máxima produção de lípidos de 0,48% p/p em relação à biomassa. À temperatura mais elevada (38°C), obtiveram o mínimo de teor de lípidos de 0,12% p/p em relação à biomassa. A máxima taxa específica de crescimento foi de 0,34 h⁻¹ à mesma temperatura (32°C) em que se obteve a máxima produção de lípidos.

A temperatura também influencia o grau de saturação, bem como a composição dos ácidos gordos dos triglicéridos. Este parâmetro atua nos sistemas enzimáticos,

nomeadamente nas dessaturases. Estas enzimas desnaturam a temperaturas altas, o que resulta na diminuição do grau de insaturação dos ácidos gordos (Donot *et al.* (2014)).

Saxena *et al.* (1998) estudaram a influência da temperatura na composição dos ácidos gordos e grau de saturação. Obtiveram maior insaturação a 32°C, decrescendo a 38°C. Verificaram ao mesmo tempo que, a 38°C, havia um aumento de ácidos gordos de cadeia curta. A temperaturas ótimas, o sistema enzimático não é afetado o que faz com que haja mais ácidos gordos insaturados de cadeia longa. Por outro lado, uma subida da temperatura (38°C) leva à desnaturação das enzimas dessaturases, diminuindo o grau de insaturação e favorecendo os ácidos gordos saturados de cadeia curta.

Para além destes autores, Zhang *et al.* (2014) e Fei *et al.* (2011) fizeram variar a temperatura em leveduras para verificar a sua influência na concentração lipídica. Ambos concluíram que as temperaturas baixas são favoráveis para a acumulação de lípidos, enquanto temperaturas altas são desfavoráveis.

Zhang *et al.* (2014) analisaram o efeito da temperatura no crescimento e concentração lipídica de *R. glutinis* em meio com glucose. A levedura atingiu maior concentração de biomassa a 30°C, comparativamente a 24°C no final da fase de crescimento exponencial. A maior concentração lipídica (6,2 g/L) foi obtida para a temperatura mais baixa de 24°C do que a obtida a 30°C (5,1 g/L) quando atingida a fase estacionária.

Fei *et al.* (2011) utilizaram ácidos gordos voláteis como fonte de carbono em culturas de *Cryptococcus albidus* conduzidas a 20°C, 25°C, 30°C e 35°C em frascos agitados. Obtiveram a máxima concentração de lípidos a 25°C (aproximadamente 0,3 g/L) e a 35°C não ocorreu acumulação de lípidos.

7.3. Agitação

A agitação das culturas determina a concentração de oxigénio no meio que, por sua vez, influencia a produção microbiana de lípidos. Há, no entanto, alguma discrepância nos resultados publicados por vários autores. Choi *et al.* (1982) e Pan *et al.* (1986) estudaram o efeito do oxigénio dissolvido em culturas de leveduras para produção de lípidos e revelaram que o oxigénio dissolvido é benéfico para o crescimento da levedura e para a produção de lípidos, uma vez que, a concentração de biomassa e o teor de lípidos aumentaram para taxas de transferência de oxigénio mais elevadas. Em contrapartida, o efeito do oxigénio dissolvido no teor lipídico foi o oposto no estudo publicado por Yen & Zhang (2011) que variaram o volume do meio de cultura e a agitação em frascos agitados pela levedura *R.*

glutinis cultivada em meio de fonte de carbono de glucose, melaço, glicerol e amido solúvel, à temperatura de 24°C. Para volumes de meio de 30, 40 e 50 mL verificaram que o máximo teor lipídico (aproximadamente 20% p/p em relação á biomassa) era obtido para o maior volume de 50 mL, o que significa, que uma baixa transferência de oxigénio foi favorável à acumulação de lípidos, enquanto a concentração de biomassa não sofreu alteração com o aumento de volume. Observou-se os mesmos resultados quando variaram a agitação dos frascos agitados de 60, 150 e 210 rpm. A 60 rpm, havendo menor disponibilidade de oxigénio dissolvido obteve-se maior teor lipídico (aproximadamente 28% p/p em relação á biomassa). Contrariamente, a 210 rpm obteve-se menor teor lipídico (20% p/p em relação á biomassa) porque a taxa de transferência de oxigénio foi maior. A concentração de biomassa mostrou uma tendência oposta, aumentando com o aumento da agitação, logo, do oxigénio dissolvido.

8. Condições de cultivo para a produção de carotenóides pelas leveduras

8.1. pH inicial do meio

O pH influencia o crescimento da levedura e a produção de carotenóides (Luo *et al.* (2013) e Latha *et al.* (2005)).

Luo *et al.* (2013) estudaram a influência do pH inicial no crescimento e produção de β -caroteno de uma levedura recombinante de vinho (*S. cerevisiae* T73-63) num meio que continha sumo de uva em frascos agitados. As condições foram realizadas a 30°C, 200 rpm em frascos agitados de 300 mL de meio. Os seus resultados demonstraram que o pH ótimo para o crescimento e produção de β -caroteno não eram os mesmos. A levedura cresceu melhor a pH 7 (10,1 g/L DCW) e produziu maior concentração em carotenóides a pH 5 (22,38 mg/L).

Foi analisado o efeito do pH inicial do meio de cultura (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 6,5; 7,5 e 9,5) no crescimento e produção de carotenóides pela levedura *R. glutinis*, por Latha *et al.* (2005). Estes autores incubaram o microrganismo num meio com glucose, à temperatura entre 29 a 32°C, e agitação de 200 rpm. Os autores verificaram que a altos valores de pH (pH 9,5) a levedura atingiu o máximo de biomassa (9,8 g/L), enquanto a pH baixo (pH 5,5) atingiu o máximo de concentração de carotenóides (3,5 mg/L).

Estes resultados corroboram os resultados de Freitas *et al.* (2014) no qual é concluído que os carotenóides produzidos pela levedura *Rhodospiridium toruloides* NCYC

921 são produtos mistos, porque estão associados ao crescimento mas acumulam principalmente na fase estacionária.

8.2. Temperatura

Aksu & Eren (2007) estudaram o efeito da temperatura na produção de carotenóides da levedura *R. glutinis* desenvolvida em frascos agitados contendo meio com glucose a pH 6.0. O máximo de concentração de carotenóides foi obtido a 30°C (63,4 mg/L) enquanto que a 25°C e 35°C a concentração de carotenóides foi menor. Resultados idênticos foram obtidos por Buzzini & Martini (1999).

Tinoi *et al.* (2005) adotaram dois métodos de forma a investigar o efeito da concentração dos substratos, pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo no crescimento e produção de carotenóides da levedura *R. glutinis* TISTR em meio que continha farinha hidrolisada de resíduos de feijão e batata doce. Através do método “One-factor-at-a-time” (FO) fizeram variar um dos fatores, mantendo todos os outros constantes. No estudo da temperatura, esta variou de 20 a 40°C sendo que o ótimo de concentração de biomassa (7 g/L) foi obtido entre 28-30°C bem como a máxima concentração de carotenóides (3 mg/L) foi obtida a essa mesma temperatura.

8.3. Agitação

Aksu & Eren (2007) estudaram a taxa de arejamento para 0; 1,2 e 2,4 vvm no crescimento e produção de carotenóides da levedura *R. glutinis*. Para a taxa de arejamento maior (2,4 vvm) obtiveram maior concentração de biomassa (5,4 g/L) e maior concentração de carotenóides (105,8 mg/L) comparativamente a um meio sem arejamento (anaeróbio).

Contudo, Cutzu *et al.* (2013) estudaram o efeito da disponibilidade de oxigênio e a razão carbono/azoto (C/N) na produção de biomassa e β -caroteno pelo mutante *Rhodotorula glutinis* 400A15, em frascos agitados. Os autores concluíram que o aumento da disponibilidade de oxigênio diminuiu ou manteve a produtividade de β -caroteno dependendo da razão C/N estudada, mas nunca aumentou.

Estudos demonstram que não há uma tendência comum no efeito da disponibilidade em oxigênio sobre a produção microbiana de carotenóides, dependendo da estirpe de levedura utilizada.

OBJETIVOS

No presente trabalho, pretendeu-se estudar não só a produção de óleo pela levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921, como a produção de outros produtos intracelulares – os carotenóides – que têm elevada procura pelas indústrias alimentares e farmacêuticas, apresentando uma elevada cotação no mercado. Esta abordagem valoriza várias frações da biomassa microbiana, o que rentabiliza o processo global de produção de biodiesel e carotenóides por via microbiana.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho consistiu no estudo do efeito das condições de cultivo de *R. toruloides* (pH, temperatura e agitação) na produção de lípidos (ácidos gordos) e carotenóides, desenvolvida em frascos agitados. As culturas foram monitorizadas em termos de concentração de biomassa, carbono e azoto residuais, e teor de ácidos gordos totais e carotenóides totais.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Microrganismo em estudo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Rhodosporidium toruloides* NCYC 921 adquirida à *Nacional Collection of Yeast Culture* (Norwich, UK). A levedura foi mantida em *slants* em meio de Agar, sob refrigeração a 4°C. Para melhor conservação da espécie, esta foi repicada para novos *slants* e incubada a 30°C durante 72 h, e posteriormente armazenada no frigorífico (4°C).

2. Crescimento do microrganismo

2.1. Preparação do Pré-Inóculo e do Inóculo

Para iniciação da preparação do pré-inóculo procedeu-se à preparação do meio de cultura descrito por Yoon & Rhee (1983). Neste ensaio, o sulfato de amónio ((NH₄)₂SO₄ (1g/L)) foi substituído pelo ureia (CH₄N₂O (0,4547 g/L)) pelo facto, de se ter mostrado em estudo anteriores que a levedura *Rhodosporidium toruloides* aumentava o seu teor lipídico quando a ureia era usada em vez do sulfato de amónio como fonte de azoto. Deste modo, o meio de cultura foi preparado nas seguintes proporções: 0,134 g/L CaCl₂.2H₂O; 0,73 g/L MgSO₄; 2 g/L Na₂HPO₄; 7 g/L KH₂PO₄; 0,5 g/L extracto de levedura; 0,4547 g/L CH₄N₂O e 35 g/L glucose.

A glucose e os sais foram esterilizados separadamente a 121°C, durante 20 minutos, e posteriormente adicionados um ao outro. O pré-inóculo foi preparado em 100 mL de meio de cultura, em Erlenmeyers de 1000 mL com anteparas, e em duplicado, sendo cada um inoculado com a biomassa de uma rampa contendo colónias de *Rhodosporidium toruloides*. Os Erlenmeyers foram incubados numa agitadora-incubadora (Unitrom Infors, Suíça) a 30°C a 150 rpm, até atingirem a fase exponencial (após 24 h).

Os ensaios realizaram-se em Erlenmeyers de 1000 mL com anteparas contendo 200 mL de meio de cultura, preparados em triplicado. Foi também preparado um ensaio controlo (contendo o mesmo meio de cultura não inoculado). Os Erlenmeyers foram inoculados com 5 mL de pré-inóculo em fase exponencial. O pH inicial do meio de cultura foi previamente ajustado a 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 adicionando-se soluções de 5M NaOH ou 5M HCL esterilizadas. Após inoculação as culturas foram incubadas a 30°C e a 150 rpm.

Para o estudo do efeito da temperatura, as culturas foram inoculadas como acima descrito, e foram incubadas a 27°C, 30°C e 33°C (fixando-se o pH a 4,5 porque foi aquele em que se obteve maior produtividade em carotenóides).

Para o estudo do efeito da agitação, as culturas foram inoculadas como acima descrito, e foram incubadas a 120 rpm, 150 rpm e 180 rpm (tendo-se ajustado previamente o pH inicial do meio a 4,5 e temperatura ótima de 30°C).

Os ensaios decorreram num período de aproximadamente 72 h, altura em que as células atingiam a fase estacionária. Ao longo desse tempo e, em períodos determinados, foram recolhidas amostras para leitura da densidade óptica (D.O.) a 600 nm (ThermoSpectronic Genesys 20, Portugal), do pH da cultura (Consort C3021, Bélgica), para observação da cultura ao microscópio (Olympus Bx60 com câmara DP10, Japão) para despiste de contaminações, centrifugação da cultura (9000 rpm a 5°C, durante 10 minutos utilizando a centrífuga (Beckman Avanti J-25I, EUA)), para recolha do sobrenadante e armazenamento, para posterior determinação de açúcares redutores e azoto residual (Tecator Lab Digestion System 61007 Digester, Suécia) e para análise de citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson Instruments, Bélgica) para quantificação de carotenóides.

A biomassa da levedura foi recolhida e colocada no congelador para posterior liofilização (Heto Power Dry LL3000 Freeze Dryer, Thermo Scientific, EUA) para posterior análise dos ácidos gordos por cromatografia gás-líquido.

3. Doseamento de Açúcares Redutores – Método do Ácido Dinitrosalicílico (DNS)

Este método consiste na oxidação de um açúcar redutor, neste caso a glucose, e na redução do ácido dinitrosalicílico (DNS). A glucose, um açúcar redutor [possui um grupo aldeído que é (redutor)] vai reagir com o ácido dinitrosalicílico, um composto de coloração alaranjada, reduzindo-o a ácido 3-amino 5-nitrosalicílico, ficando o açúcar oxidado. A técnica envolve um aquecimento para catalisar a reação após o DNS ser adicionado à amostra e posterior leitura da absorvância no espectrofotómetro.

Iniciou-se a preparação da solução stock (solução padrão de glucose) com a finalidade de se construir uma curva-padrão para determinação da concentração da glucose nas amostras colhidas durante os ensaios. A partir desta solução stock (solução mãe de 1,5 g/L) foram preparados os padrões com diluições de 0 a 10 mL (0; 0,5; 1; 5; 8; 10 mL) para 10 mL de volume total. Estes padrões foram preparados em duplicado.

De seguida, passou-se à preparação das amostras as quais foram diluídas e analisadas em triplicado. A segunda fase consistiu em adicionar 0,5 mL de reagente DNS em 0,5 mL de amostra (amostras e padrões). Foram ao vórtex e levadas a banho quente (100°C) durante 5 minutos. Decorrido esse tempo foram ao gelo durante o mesmo período de tempo. A cada tubo de ensaio foram adicionados 5 mL de água millipore, feito o vórtex e lida a densidade óptica a 550 nm fazendo-se o branco com água destilada.

4. Transesterificação

Esta técnica consiste numa reação de transesterificação em que os ácidos gordos são convertidos nos respetivos ésteres metílicos. Para cada ensaio, as amostras foram analisadas em duplicado. De seguida, é explicado o procedimento adotado seguindo o protocolo de Lapage & Roy com algumas alterações.

1. Foram pesados para cada tubo Schott 100 mg de biomassa liofilizada.
2. Foi preparada uma mistura reacional de metanol e cloreto de acetilo (95:5 v/v). Em banho de gelo foi adicionado primeiro o metanol e, de seguida, o cloreto de acetilo obtendo-se a mistura desejada.
3. Foram pipetados 2 mL dessa mistura para cada tubo Schott.
4. Adicionaram-se 0,2 mL de solução de padrão interno – ácido heptadecanóico (C17:0) (5 mg/mL de padrão interno ácido heptadecanóico (Nu-Chek. Prep) dissolvido em éter de petróleo 80%, 80°C/100°C).
5. Os Schotts foram a banho-maria com aquecimento a 80°C durante 1h protegidos da luz.
6. Decorrida 1h foram arrefecidos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
7. Procedeu-se à extração em que foi adicionado 1 mL de n-heptano em cada tubo Schott e 1 mL de água destilada. Esperou-se 20 minutos para formação e separação das fases.
8. Iniciou-se a filtração. A fase superior (ésteres metílicos de ácidos gordos) foi removida e transferida para um filtro de algodão com sulfato de sódio anidro inserida num *vial*.
9. Ao *vial* com o filtrado foi adicionado azoto durante 5 segundos para evitar a oxidação da amostra.
10. Passou-se à quantificação e identificação dos ácidos gordos por cromatografia gasosa. Antes de ser feita a análise em cromatógrafo (Bruker 436-GC, EUA), as amostras foram diluídas em heptano filtrado.

5. Determinação de Azotos

A determinação de azotos foi feita seguindo o princípio de Kjeldahl. Este princípio consiste em duas etapas: a etapa de mineralização ou digestão e a etapa de destilação.

Para a etapa de digestão fez-se reagir a amostra (4 mL de sobrenadante) com ácido sulfúrico 96% (20mL) à temperatura de ebulição, na presença de um catalisador (1g) utilizando para isso, um sistema de digestão. Deste modo, o azoto orgânico presente na amostra vai ser convertido em sulfato de amônio podendo verificar-se no final da digestão, que termina após aproximadamente 3h, que a coloração muda para verde fluorescente.

A destilação que é feita por arraste de vapor, consiste em expor o sulfato de amônio com uma base em excesso (12,5M NaOH) para permitir a libertação do amoníaco que é coletado num Erlenmeyer que contém ácido bórico 4% (50 mL com três gotas de indicador). O processo é finalizado quando todo o amoníaco se libertou. O procedimento iniciou-se no sistema de destilação Kjetec fazendo-se o branco. Depois disso, foi-se trocando as amostras de tempo a tempo após terminado o ciclo de cada uma fazendo-se a titulação. Durante a destilação e, à medida que se vai formando borato de amônio (da reação do ácido bórico com o amoníaco) a cor muda para um tom azulado que após titulação com ácido clorídrico 1M por viragem do indicador deve adquirir a mesma tonalidade que indicador (roxo).

6. Citometria de fluxo na deteção de carotenóides

Num estudo anterior realizado por Freitas *et al.* (2014) foi estabelecida uma correlação entre a autofluorescência das células lida por citometria de fluxo, e o teor de carotenóides totais analisado pelo método gravimétrico (método tradicional). Esta correlação foi estabelecida com vista a reduzir o tempo de análise dos carotenóides totais através dos métodos gravimétricos tradicionais, que dura dias, comparado com a leitura da autofluorescência das células pelo citómetro de fluxo, cujo resultado é obtido alguns minutos após a colheita da amostra. Para além deste inconveniente, o método tradicional requer uma grande quantidade de biomassa para análise. Tendo sido recolhidas amostras ao longo da curva de crescimento, constatou-se que as autofluorescências lidas nos vários canais aumentavam ao longo do tempo de cultivo, e apresentavam o mesmo perfil que a curva do teor de carotenóides totais obtida através do método gravimétrico. Também foi verificado que a melhor correlação para determinar o teor total de carotenóides foi a estabelecida entre a autofluorescência detetada no canal FL₃ e o teor de carotenóides determinado pelo método clássico:

Teor total de carotenóides ($\mu\text{g/g}$) = $4,36 \cdot \text{FL}_3 - 11,45$, $R^2 = 0,987$ (Equação 1)

Desta forma, esta correlação foi usada para determinar o teor de carotenóides totais nas células da levedura.

7. Cálculos

7.1. Biomassa

Uma vez lida a absorvância da amostra em espectrofotómetro a 600 nm calculou-se a concentração da biomassa (g.L^{-1}) aplicando a seguinte fórmula:

Concentração da Biomassa (g/L) = $0,7062 \times \text{Densidade ótica} + 0,4338$ (Equação 2)

7.2. Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada selecionando-se os pontos correspondentes à fase exponencial da levedura, num gráfico \ln versus tempo. Traçou-se a correlação linear cujo declive correspondente a μ . A taxa específica de crescimento (μ) corresponde ao declive da reta de acordo com a equação 3:

$\ln X = \ln X_0 + \mu t$ (Equação 3)

7.3. Taxa volumétrica de consumo de glucose

A taxa volumétrica de consumo de glucose foi calculada através da equação 4:

$$r_s = \frac{S_i - S_f}{\Delta t} \text{ (Equação 4)}$$

Equação 4. Taxa volumétrica de consumo de glucose. Onde, r_s corresponde à taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$); S_i – concentração de glucose inicial (g.L^{-1}); S_f – concentração de glucose final (g.L^{-1}) e Δt – intervalo de tempo decorrido (h).

7.4. Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono

O rendimento de biomassa em relação à fonte de carbono é a quantidade de biomassa que se forma por unidade de massa do nutriente:

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \text{ (Equação 5)}$$

Equação 5. Rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono. Onde, $Y_{x/s}$ corresponde ao rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($\text{g}_{\text{biomassa}} \cdot \text{g}_{\text{subs.consumido}}^{-1}$); X_f – concentração de biomassa final (g.L^{-1}); X_i – concentração de

biomassa inicial (g.L^{-1}); S_i – concentração de glucose inicial (g.L^{-1}) e S_f – concentração de glucose final (g.L^{-1}).

7.5. Produtividade volumétrica da biomassa

A produtividade volumétrica da biomassa é calculada dividindo a biomassa formada no intervalo de tempo Δt , por esse intervalo de tempo:

$$P_x = \frac{X_f - X_i}{\Delta t} \text{ (Equação 6)}$$

Equação 6. Produtividade volumétrica da biomassa. Onde, P_x corresponde à produtividade volumétrica da biomassa ($\text{g}_{\text{biomassa}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); X_f – concentração da biomassa final (g.L^{-1}); X_i – concentração de biomassa inicial (g.L^{-1}) e Δt – intervalo de tempo decorrido (h).

7.6. Ácidos Gordos

Como referido anteriormente, os ácidos gordos foram quantificados por cromatografia em fase gasosa. Desta técnica, resulta um cromatograma cuja área dos picos é proporcional à concentração de um dado componente (Harper *et al.* (1982)). Deste modo, primeiro procedeu-se à identificação de cada componente por comparação com os tempos de retenção de um padrão de composição conhecida (Nu-Chek-Prep, Elysian, MN, USA). Depois de identificados, aplicou-se o seguinte cálculo para obter a massa de cada éster metílico:

$$m_{AG} = \frac{\text{Área AG}}{\text{Área C17:0}} \times FR_{AG} \text{ (Equação 7)}$$

Equação 7. Massa do ácido gordo. Onde, m_{AG} corresponde à massa de ácido gordo; Área AG – área do pico do ácido gordo; Área C17:0 – área do pico do padrão interno e FR AG – fator de resposta do ácido gordo, considerado igual a 1.

A massa total de ácidos gordos é dada pela soma das m_{AG} . A percentagem mássica de cada ácido gordo AG_i é obtida através da seguinte fórmula:

$$AG (\%p/p) = m_{AG_i} / \sum m_{AG_i} \text{ (Equação 8)}$$

A percentagem de ácidos gordos totais em relação à biomassa (p/p) é calculada através da equação:

$$AG \text{ totais } (\%p/p \text{ em relação à biomassa}) = \sum m_{AG_i} / m, \text{ (Equação 9)}$$

Sendo m a toma da biomassa (mg) utilizada na análise dos AG.

7.7. Concentração de ácidos gordos totais

A concentração de ácidos gordos totais foi determinada com base na seguinte equação:

$$C_{AGT} = \frac{AG (\%p/p) \times (X_f - X_i)}{100} \text{ (Equação 10)}$$

Equação 10. Concentração de ácidos gordos totais. Onde, C_{AGT} corresponde à concentração de ácidos gordos totais (g.L^{-1}); $AG (\%p/p)$ – teor de ácidos gordos em percentagem; X_f – concentração de biomassa final (g.L^{-1}) e X_i – concentração de biomassa inicial (g.L^{-1}).

7.8. Rendimento dos ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono

O rendimento dos ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono calcula-se através da equação 11:

$$Y_{AGT/S} = \frac{C_{AGT}}{S_i - S_f} \text{ (Equação 11)}$$

Equação 11. Rendimento dos ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono. Onde, $Y_{AGT/S}$ corresponde ao rendimento dos ácidos gordos totais em relação à fonte de carbono ($\text{g}_{\text{ácidos gordos totais}} \cdot \text{g}_{\text{subs.consumido}}^{-1}$); C_{AGT} – concentração de ácidos gordos totais (g.L^{-1}); S_i – concentração de glucose inicial (g.L^{-1}) e S_f – concentração de glucose final (g.L^{-1}).

7.9. Produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais

A produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais foi calculada dividindo a concentração de ácidos gordos totais pelo tempo do ensaio:

$$P_{AGT} = \frac{C_{AGT}}{\Delta t} \text{ (Equação 12)}$$

Equação 12. Produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais. Onde, P_{AGT} corresponde à produtividade volumétrica dos ácidos gordos totais ($\text{g}_{\text{ácidos gordos totais}} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); C_{AGT} – concentração de ácidos gordos totais (g.L^{-1}) e Δt – intervalo de tempo decorrido (h).

7.10. Concentração dos carotenóides totais

A concentração de carotenóides totais foi calculada da seguinte forma:

$$C_{CT} = CT \times (X_f - X_i) \text{ (Equação 13)}$$

Equação 13. Concentração de carotenóides totais. Onde, C CT corresponde á concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g}_{\text{carotenóides totais}}\cdot\text{L}^{-1}$); CT – teor de carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); Xf – concentração de biomassa final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e Xi – concentração de biomassa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

7.11. Rendimento aparente dos carotenóides totais em relação á fonte de carbono

O rendimento dos carotenóides totais em relação à fonte de carbono pode calcular-se sabendo-se a concentração de carotenóides totais e o carbono consumido:

$$Y_{CT/S} = \frac{C_{CT}}{S_i - S_f} \text{ (Equação 14)}$$

Equação 14. Rendimento dos carotenóides totais em relação à fonte de carbono. Onde, Y CT/S corresponde ao rendimento em carotenóides totais ($\mu\text{g}_{\text{carotenóides totais}}\cdot\text{g}_{\text{subs.consumido}}^{-1}$); C CT – concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); Si – concentração de glucose inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e Sf – concentração de glucose final ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

7.12. Produtividade volumétrica dos carotenóides totais

A produtividade volumétrica dos carotenóides totais foi calculada dividindo a diferença de concentração de carotenóides totais pelo tempo:

$$P_{CT} = \frac{C_{CT}}{\Delta t} \text{ (Equação 15)}$$

Equação 15. Produtividade volumétrica dos carotenóides totais. Onde, P CT corresponde á produtividade volumétrica dos carotenóides totais ($\mu\text{g}_{\text{carotenóides totais}}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$); C CT – concentração de carotenóides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e Δt – intervalo de tempo decorrido (h).

7.13. Concentração de azoto

A concentração de azoto foi calculada a partir do teor de azoto que se relaciona com a quantidade de amostra efetivamente pesada (g) e o volume titulado (mL). O teor de azotos em percentagem pode calcular-se da seguinte forma:

$$\% \text{ Azoto} = \frac{0,14 \times \text{Titulado}}{\text{Amostra}} \text{ (Equação 16)}$$

Equação 16. Teor do azoto (%). Onde, % Azoto corresponde ao teor de azoto em percentagem; Titulado – volume de HCL gasto na titulação em (mL) e Amostra – peso da amostra pesada em (g).

A partir do teor de azoto pode então calcular-se a concentração da fonte de azoto do seguinte modo:

$$CN = \frac{\% \text{ Azoto} \times 1000}{100} \text{ (Equação 17)}$$

Equação 17. Concentração de azoto. Onde, C N corresponde á concentração de azoto (g.L⁻¹) e % Azoto corresponde ao teor de azoto, em percentagem.

7.14. Taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto

Sabendo-se a concentração de azoto inicial e final e o intervalo de tempo decorrido calculou-se a taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto do seguinte modo:

$$rN = \frac{Ni - Nf}{\Delta t} \text{ (Equação 18)}$$

Equação 18. Taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto. Onde, r_N corresponde á taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (g.L⁻¹.h⁻¹); Ni – concentração de fonte de azoto inicial (g.L⁻¹); Nf – concentração de azoto final (g.L⁻¹) e Δt – intervalo de tempo decorrido (h).

7.15. Rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto

Sabendo-se a concentração de biomassa final e inicial e o azoto consumido:

$$Y_{X/N} = \frac{Xf - Xi}{Ni - Nf} \text{ (Equação 19)}$$

Equação 19. Rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto. Onde, Y_{X/N} corresponde ao rendimento em biomassa em relação à fonte de azoto (g_{biomassa}.g_{azoto consumido}⁻¹); Xf – concentração de biomassa final (g.L⁻¹); Xi – concentração de biomassa inicial (g.L⁻¹); Ni – concentração de azoto inicial (g.L⁻¹) e Nf – concentração de azoto final (g.L⁻¹).

Nota: A Lista dos Reagentes encontra-se em Anexo I.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo do pH inicial do meio de cultura no crescimento e produção de lípidos (ácidos gordos) e carotenóides totais da levedura *R. toruloides* NCYC 921

1.1. Efeito do pH inicial no crescimento de *R. toruloides*

O pH do meio de cultura é um dos fatores que mais influencia a produção de lípidos e carotenóides por leveduras (Luo *et al.* (2013)).

Como se pode verificar na figura 2, o pH inicial do meio de cultura que induziu a máxima concentração de biomassa foi a 4,0 podendo dizer-se que este é o pH ótimo de crescimento da levedura. Este resultado é inesperado, uma vez que, os trabalhos publicados que utilizaram esta estirpe de levedura (Yoon & Rhee (1983) e Pan *et al.* (1986)) realizaram ensaios de crescimento da levedura a pH 5,5.

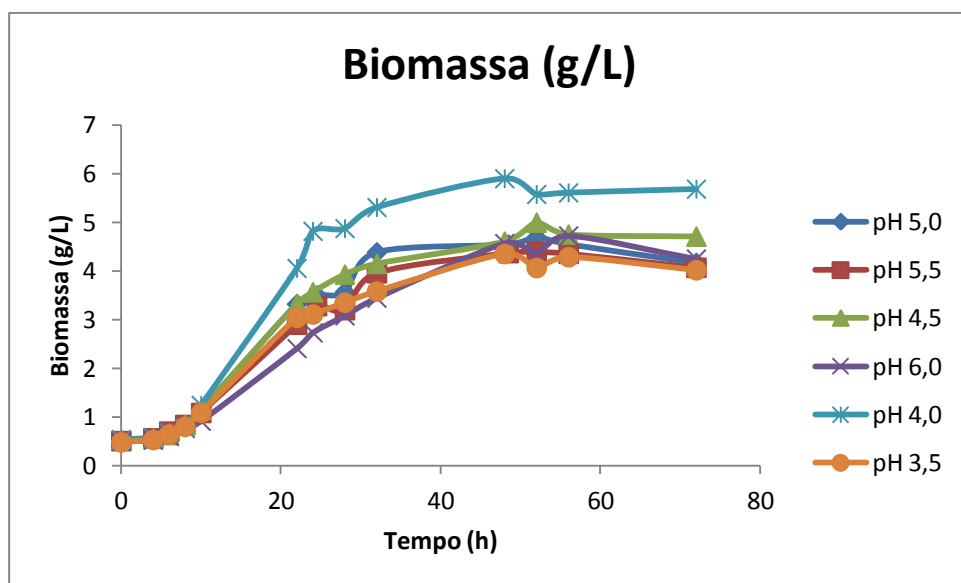


Figura 2. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* em frascos agitados. [Os valores de biomassa correspondem à média das leituras de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

A este pH observa-se uma fase de adaptação, a fase de latência, que se verifica até às 4 h (Figura 3). Ao fim de 6 h de crescimento, a levedura entrou em fase exponencial duplicando o seu crescimento. A partir das 24 h, o microrganismo cessa o seu crescimento,

entrando na fase estacionária e atingindo a concentração máxima de biomassa de $5,90 \text{ g.L}^{-1}$ ao fim de 48 h.

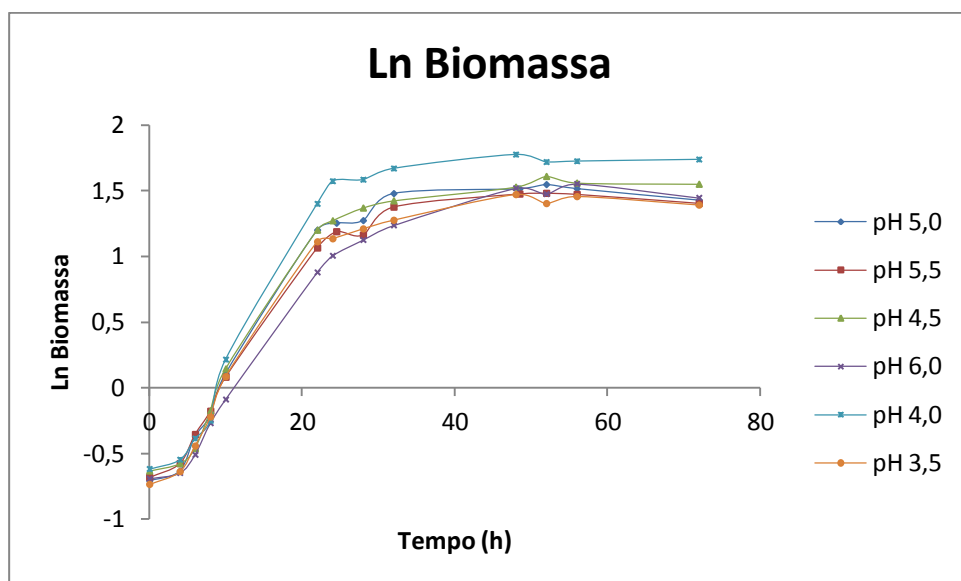


Figura 3. Gráfico Ln Biomassa *versus* tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides*.

A fase de latência das culturas desenvolvidas a pH 5,0; 5,5; 4,5; 6,0 e 3,5 também demorou 4 h. Todas as culturas entraram em fase exponencial ao fim de 6 h e em fase estacionária ao fim de aproximadamente 24 h.

A pH 4,5; 5,0 e 5,5 foi atingida a máxima concentração de biomassa às 52 h no valor de $5,00 \text{ g.L}^{-1}$; $4,69 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,39 \text{ g.L}^{-1}$, respetivamente. O máximo de concentração de biomassa foi atingido às 56 h a pH 6,0 ($4,72 \text{ g.L}^{-1}$) e às 48 h a pH 3,5 ($4,35 \text{ g.L}^{-1}$).

Na tabela 1, estão representadas as taxas específicas de crescimento, a concentração máxima de biomassa e a produtividade em biomassa para cada pH.

Tabela 1. Taxa específica de crescimento (μ), concentração da biomassa máxima (X_{\max}) e produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para cada pH.

pH	μ (h^{-1})	X_{\max} (g.L^{-1})	P_x ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
3,5	0,09	3,87	0,05
4,0	0,11	5,36	0,07
4,5	0,09	4,47	0,06
5,0	0,09	4,20	0,05
5,5	0,08	3,89	0,05
6,0	0,08	4,22	0,05

A pH 4,0 obteve-se a máxima taxa específica de crescimento ($0,11 \text{ h}^{-1}$), a máxima produtividade volumétrica de biomassa ($0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e a concentração de biomassa máxima ($5,36 \text{ g.L}^{-1}$).

A taxa específica de crescimento obtida ao pH de 4,0 é mais baixa do que a obtida por Aksu & Eren (2007) que estudaram o crescimento da levedura *Rhodotorula glutinis* em frascos agitados a 30°C , 100 rpm e obtiveram a taxa específica de crescimento a pH 6,0 no valor de $0,238 \text{ h}^{-1}$. Estes autores reportaram que a taxa específica de crescimento aumenta com o aumento do pH. Esta diferença pode ser devida ao facto da espécie utilizada não ser a mesma, e a composição do meio de cultura e condições de cultivo serem diferentes.

Taccari *et al.* (2012) estudaram 45 estirpes de leveduras entre as quais *R. glutinis* em frascos agitados utilizando glucose como fonte de carbono a 25°C , 130rpm. Obtiveram uma taxa específica de crescimento de $0,15 \text{ h}^{-1}$ para *R. glutinis* DiSVA V10 e $0,17 \text{ h}^{-1}$ para *R. glutinis* DiSVA V11. Estes valores de taxa específica de crescimento estão mais próximos dos valores obtidos no presente trabalho.

Na figura 4 pode observar-se a variação do pH ao longo do tempo de cultura. Verifica-se que, para todas as culturas, o pH do meio de cultura diminui, ao longo do tempo, estabilizando no final do ensaio mantendo-se constante entre os valores 2,72 e 3,26.

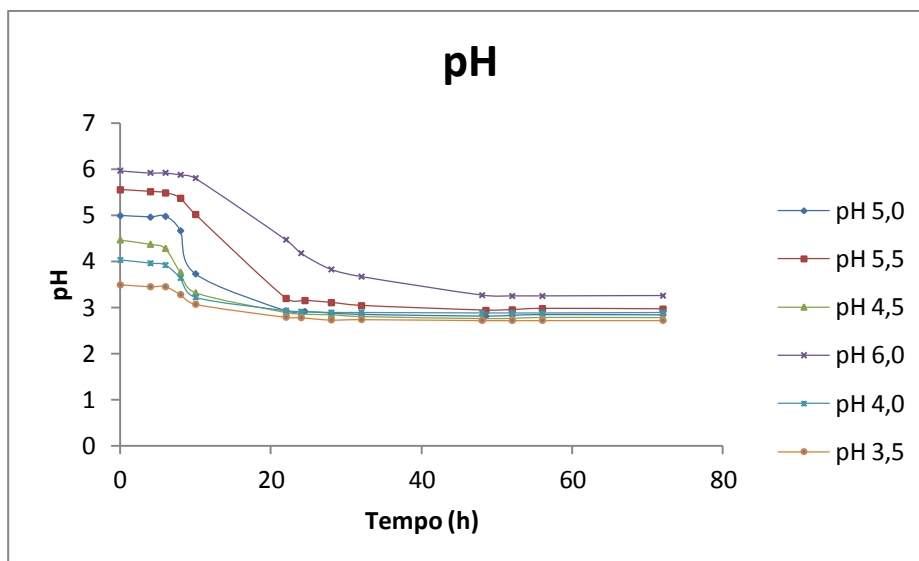


Figura 4. Variação do pH ao longo do tempo para cada pH.

A cultura com o pH inicial de 3,5 atingiu o pH mais baixo de 2,72 ao fim de 72h. O pH final mais alto (3,26) observou-se para a cultura com o pH inicial de 6,0. Os outros pHs finais obtidos foram 2,77 a pH 4,5; 2,84 a pH 5,0; 2,89 a pH 4,0 e 2,96 a pH 5,5.

A diminuição do pH ao longo do crescimento da levedura está relacionada com a presença de metabolitos ácidos produzidos no ciclo de Krebs, em resultado do metabolismo celular. A descida do pH do meio poderá ter sido responsável pela inibição do crescimento celular.

Quanto à concentração residual de glucose, constatou-se que em nenhum dos ensaios ocorreu esgotamento da glucose (Figura 5) o que de facto sugere que o crescimento da levedura cessou por inibição devido à presença de metabolitos ácidos, ou por esgotamento de outro nutriente (que não a glucose). Também se verificou uma ligeira subida da concentração de glucose no início do ensaio, o que pode ter sido devido ao meio não estar totalmente homogeneizado no início do ensaio (t=0 h).

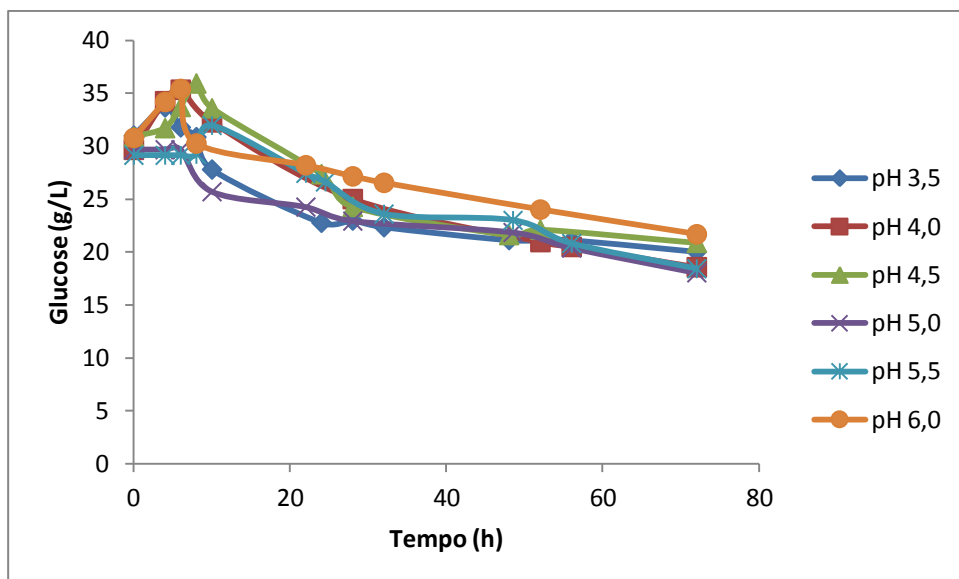


Figura 5. Concentração da glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para os ensaios realizados a diferentes pHs. [Os valores da concentração da glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

Na Tabela 2 apresenta-se o consumo de glucose, rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono (glucose) e a taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose.

Tabela 2. Consumo de glucose, rendimento da biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{x/s}$) e taxa volumétrica de consumo da fonte de glucose (r_s). [Os valores da concentração de glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

pH	Consumo de Glucose (g.L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	r_s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
3,5	10,98	0,32	0,15
4,0	11,10	0,46	0,15
4,5	10,01	0,42	0,14
5,0	11,64	0,32	0,16
5,5	10,73	0,33	0,15
6,0	9,10	0,41	0,13

Através da tabela 2, pode observar-se que, para as diferentes culturas, os consumos de glucose não variam muito (entre 10 e 11 g.L⁻¹) exceto para a cultura com o pH inicial de 5,0 que apresentou um consumo de glucose de 11,64 g.L⁻¹ e para a cultura com o pH inicial de 6,0, onde se verificou o consumo de glucose mais baixo (9,10 g.L⁻¹). O rendimento em

biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{X/S}$) foi máximo para a cultura com o pH inicial de 4,0 (0,46 g.g⁻¹), o que está de acordo com o facto da máxima concentração de biomassa ter sido observada para esta cultura e foi mínimo para as culturas com os pHs iniciais de 3,5 e 5,0 (0,32 g.g⁻¹).

Taccari *et al.* (2012) analisaram o crescimento de *R. glutinis* num meio com glucose em frascos agitados incubados a 25°C, 130 rpm e os rendimentos em biomassa variaram entre 0,75 g/g (*R. glutinis* DiSVA V11) e 0,80 g/g (*R. glutinis* DiSVA V10). Os valores são mais elevados do que os rendimentos apresentados na Tabela 2 (0,32 g/g a 0,46 g/g). Segundo pesquisas feitas por estes autores, o $Y_{X/S}$ varia tipicamente entre 0,4 e 0,8 g/g para leveduras que se desenvolvem aerobicamente.

A taxa volumétrica de consumo de glucose (r_s) foi máxima para a cultura a pH inicial de 5,0 (0,16 g.L⁻¹.h⁻¹) e mínima para a cultura com o pH inicial de 6,0 (0,13 g.L⁻¹.h⁻¹).

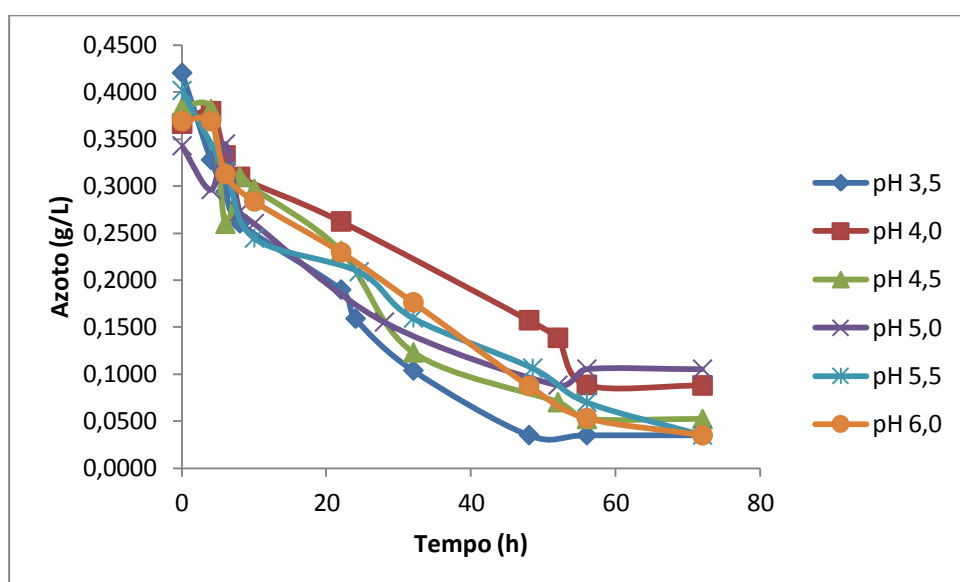


Figura 6. Evolução da concentração de Azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada pH.

A figura 6 mostra o perfil das concentrações residuais de azoto ao longo do tempo de cultivo dos ensaios. Em nenhuma das culturas o azoto esgotou completamente. A Tabela 3 apresenta os consumos, taxas volumétricas de consumo de azoto r_N e rendimentos da biomassa em relação ao azoto ($Y_{X/N}$) para as culturas realizadas a diferentes pHs.

Tabela 3. Consumo de azoto, rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada pH.

pH	Consumo Azoto (g.L ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g.g ⁻¹)	r_N (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
3,5	0,39	9,18	0,005
4,0	0,28	18,48	0,004
4,5	0,33	12,60	0,005
5,0	0,24	15,47	0,003
5,5	0,37	9,72	0,005
6,0	0,33	11,22	0,005

O consumo mais baixo de azoto foi observado para a cultura com o pH inicial de 5,0 (0,24 g.L⁻¹) e o mais elevado verificou-se para a cultura com o pH inicial de 3,5 (0,39 g.L⁻¹).

Em relação à taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto obteve-se o menor valor a pH 5,0 (0,003g.L⁻¹.h⁻¹). O rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto foi maior a pH 4,0 (18,48 g.g⁻¹) e menor a pH 3,5 (9,18 g.g⁻¹).

1.2. Efeito do pH inicial na produção de carotenóides

Como se pode ver na tabela 4, o máximo teor de carotenóides (63,37 µg.g⁻¹) foi obtido para pH 5,0. Observa-se assim que o pH que conduziu à máxima concentração de biomassa (4,0) foi diferente do que conduziu ao máximo teor de carotenóides totais (CT) (5,0). Contudo, foi a pH 4,5 que se obteve a máxima concentração de CT (263,31 µg.L⁻¹), a máxima produtividade em CT (3,66 µg.L⁻¹.h⁻¹) e o máximo rendimento em carotenóides (26,29 µg.g⁻¹). Luo *et al.* (2013) estudaram o efeito do pH inicial no crescimento e produção de β-caroteno da levedura recombinante *S. cerevisiae* T73-63. Eles afirmam, que o pH ótimo de crescimento foi atingido a pH 7,0 (10,1 g/L) e o teor máximo e a concentração máxima em carotenóides foram atingidos a pH 5,0, num estudo em que o pH variou entre 4,0 e 7,0. Segundo estes autores a produção de β-caroteno é favorecida a um baixo valor de pH (pH 5,0 comparativamente a pH 6,0 e 7,0). Nestes resultados, a pH 3,5 e 4,0 obtiveram-se valores inferiores em termos de teor, concentração, produtividade e rendimento em carotenóides. Também Luo *et al.* (2013) obtiveram menor teor e concentração de carotenóides a pH 4,0 comparativamente a pH 5,0.

Tabela 4. Efeito do pH inicial na produção de carotenóides pela levedura *R. toruloides*.

pH	CT ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	C CT ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Pv CT ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Y CT ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
3,5	26,07	92,21	1,28	8,40
4,0	19,61	100,89	1,40	9,09
4,5	63,02	263,31	3,66	26,29
5,0	63,37	232,89	3,23	20,01
5,5	46,84	166,88	2,32	15,56
6,0	36,15	135,44	1,88	14,88

Em contrapartida, estes resultados diferem dos obtidos por Aksu & Eren (2007) e Latha *et al.* (2005) que obtiveram o máximo de concentração de carotenóides a pHs elevados, respetivamente pH 6,0 e pH 5,5 para a espécie *Rhodotorula glutinis*.

1.3. Efeito do pH inicial na produção de ácidos gordos

Segundo a Tabela 5, o teor, concentração, produtividade e rendimento máximo de ácidos gordos totais (AGT) foi obtido a pH 4,0 (21,85% p/p; 1,12 g.L^{-1} ; 0,02 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$; 0,10 g.g^{-1} , respetivamente).

Tabela 5. Efeito do pH inicial na produção de ácidos gordos pela levedura *R. toruloides*. [Os valores dos AGT foram obtidos a partir de dois replicados independentes com um desvio-padrão que não excedeu 10% (n=2)].

pH	AGT (%p/p)	C AGT (g.L^{-1})	Pv AGT ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Y AGT (g.g^{-1})
3,5	15,71	0,56	0,01	0,05
4,0	21,85	1,12	0,02	0,10
4,5	17,98	0,75	0,01	0,08
5,0	16,95	0,62	0,01	0,05
5,5	15,13	0,54	0,01	0,05
6,0	16,57	0,62	0,01	0,07

Verifica-se que o pH que induziu a máxima concentração de AGT foi o mesmo que induziu a máxima concentração de biomassa (4,0), mas diferente do pH que induziu o máximo teor de CT. Estes resultados corroboram os resultados descritos por Freitas *et al.* (2014) segundo os quais os AGT são metabolitos primários (ou seja, produzidos durante o

crescimento da levedura), enquanto os CT são metabolitos intermediários (produzidos durante o crescimento da levedura e também durante a fase estacionária). Xue *et al.* (2006) e de Karatay & Dönmez (2010) estudaram o efeito do pH no teor lipídico das leveduras *R. glutinis* e *R. mucilaginosa* em frascos agitados. Xue *et al.* (2006) afirmam que o pH ótimo em termos de teores de ácidos gordos é pH 5,5 e Karatay & Dönmez (2010) obtiveram o máximo teor lipídico a pH 5,0. Estes resultados levam a concluir que as condições que levam à produção máxima de lípidos e carotenóides variam de estirpe para estirpe.

Para os ensaios subsequentes foi selecionado o pH 4,5 porque embora se tenha obtido maior taxa específica de crescimento, produtividade em biomassa e AGT a pH 4,0, a pH 4,5 obteve-se maior produtividade em CT. Como os carotenóides são um produto de alto valor acrescentado, foi selecionado o pH para o qual se obteve o máximo de produção de carotenóides.

1.3.1. Efeito do pH na composição dos ácidos gordos

A tabela 6 ilustra a variação da composição dos ácidos gordos com o pH. Pode verificar-se, que os ácidos gordos maioritários, para todos os pHs, são o ácido oleico (C18:1 ω 9) e o ácido linoleico (C18:2 ω 6). Os AG MIS (constituídos pelo 18:1 ω 9) são a classe maioritária, tendo sido produzidos numa proporção de cerca de 40%, atingindo o seu máximo a pH 5,5. Os AG SAT (16:0, 18:0, 22:0, 24:0) variam entre 35,03% (a pH 3,5) e 37,62% (a pH 6,0). Os AG PIS (18:2 ω 6 e 18:3 ω 3) variaram entre 21,22 (pH 4,5) e 25,67% (pH 3,5). No geral não se observaram diferenças significativas na composição dos ácidos gordos com a variação do pH.

Segundo a norma EN 14214/2009 do Comité Europeu de Normalização, para que o biodiesel seja considerado de boa qualidade a percentagem de ácido linolénico (18:3 ω 3) não deve exceder os 12% p/p tal como os ácidos gordos polinsaturados com quatro ou mais ligações duplas não deve exceder os 1% p/p (Januário (2014) e Freitas *et al.* (2014)). No presente trabalho, o máximo de ácido linolénico atingido foi 3,34% p/p e não foram detetados ácidos gordos com quatro ou mais duplas ligações, o que indica, que o biodiesel se encontra dentro dos parâmetros adequados, estando assegurada a sua boa qualidade.

Tabela 6. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para os pHs 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0.

Ácidos Gordos Perfil	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0
16:0	14,06±0,12	13,82±0,17	14,15±0,14	13,41±0,10	12,52	13,86±0,07
18:0	17,20±0,02	15,73±0,06	18,73±0,24	17,86±0,07	17,46	18,72±0,04
18:1 ω9	39,28±0,21	41,04±0,09	41,41±0,21	41,54±0,19	41,67	38,39±0,20
18:2 ω6	22,33±0,42	22,10±0,00	18,75±0,27	19,67±0,18	20,85	21,03±0,23
18:3 ω3	3,34±0,06	3,27±0,02	2,47±0,06	2,67±0,02	2,84	2,95±0,04
22:0	2,20±1,40	1,28±0,01	0,70±0,99	1,37±0,00	1,35	1,47±0,01
24:0	1,57±2,23	2,76±0,01	3,78±0,07	3,47±0,02	3,31	3,57±0,04
SATURADOS (SAT)	35,03	33,59	36,85	36,11	34,64	37,62
MONOINSATURADOS (MIS)	39,28	41,04	41,41	41,54	41,67	38,39
POLINSATURADOS (PIS)	25,67	25,37	21,22	22,34	23,69	23,98

Dyal & Narine (2005) afirmam que os ácidos gordos saturados e monoinsaturados decrescem com o aumento do pH enquanto os ácidos gordos polinsaturados aumentam com o aumento do pH, o que não se verificou neste trabalho.

2. Efeito da temperatura no crescimento e produção de carotenóides e ácidos gordos pela levedura *R. toruloides* NCYC 921

2.1. Efeito da temperatura no crescimento de *R. toruloides*

A temperatura também é um dos parâmetros que afeta não só o crescimento como também a produção de lípidos e carotenóides por leveduras (Donot *et al.* (2014) e Hernández-Almanza *et al.* (2014)).

Como se pode ver na figura 7, a temperatura que induziu a máxima concentração de biomassa foi a temperatura de 30°C.

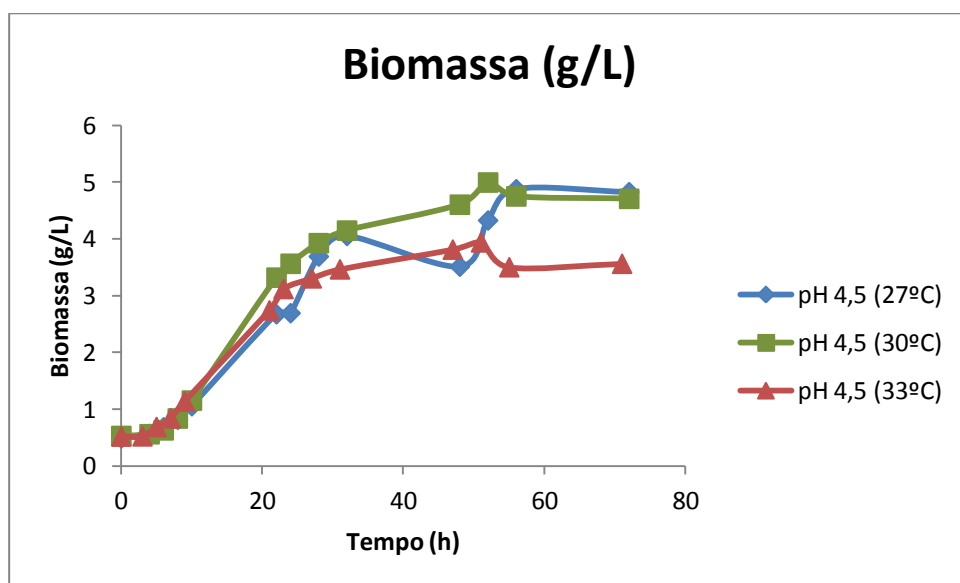


Figura 7. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* para cada temperatura, em frascos agitados. [Os valores de biomassa correspondem à média das leituras de triplicados, com um desvio padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

Na figura 8 estão representadas as curvas de crescimento da levedura para as diferentes temperaturas.

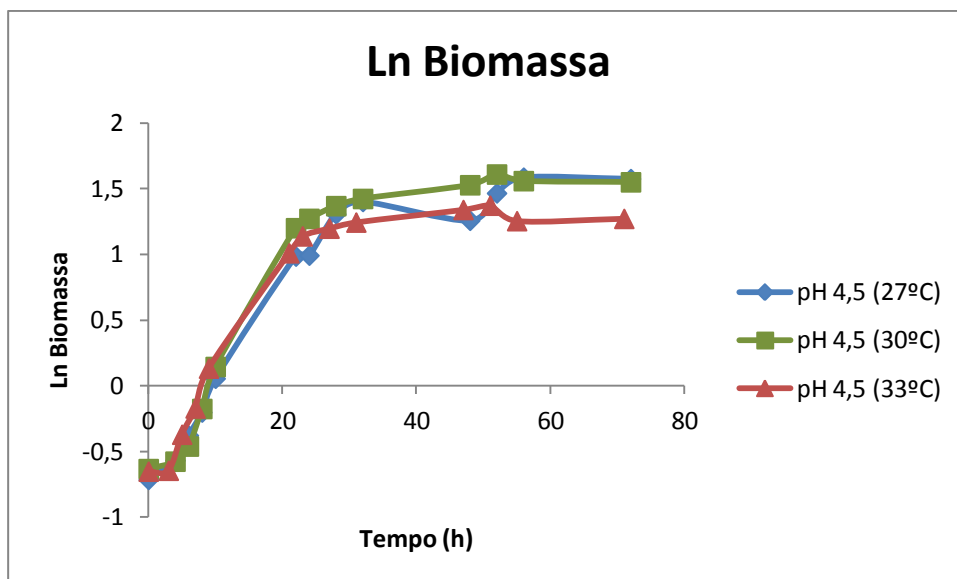


Figura 8. Gráfico Ln Biomassa *versus* tempo (h) referente ao crescimento de *R. toruloides* para cada temperatura.

Através da figura 8, pode observar-se que à temperatura de 27°C a levedura apresentou uma fase de latência curta, uma vez que, entrou logo em fase exponencial às 4 h que se prolongou até às 24 h. Nesse momento entrou em fase estacionária até às 72 h tendo atingido o máximo de concentração de biomassa de $4,88 \text{ g.L}^{-1}$ às 56 h. No ensaio cultivado a 30°C a fase de latência durou até às 4h, entrando em fase exponencial às 6 h que se prolongou até às 24 h, tendo atingido o máximo de biomassa de $5,00 \text{ g.L}^{-1}$ às 52 h. No ensaio a 33°C a fase de latência deu-se das 0 h às 3 h e a fase exponencial das 5 h às 23 h atingindo o máximo de biomassa de $3,94 \text{ g.L}^{-1}$ às 51 h.

Como se pode verificar, a temperatura ótima de crescimento da levedura é a 30°C com uma taxa específica de crescimento de $0,09 \text{ h}^{-1}$. A taxa específica de crescimento é de $0,08 \text{ h}^{-1}$ para as temperaturas de 27°C e 33°C (tabela 7). Aksu & Eren (2007) estudaram o crescimento da levedura *R. glutinis* em frascos agitados num meio sintético contendo glucose a temperaturas de 25°C a 35°C e também obtiveram o máximo de μ a 30°C com o valor de $0,238 \text{ h}^{-1}$ ao pH inicial de 6,0.

Suutari *et al.* (1990) também estudaram o efeito da temperatura no crescimento de *Rhodospiridium toruloides* VTT-C-82132 em frascos agitados num meio que continha glicerol sendo que a temperatura ótima de crescimento para este microrganismo foi 26°C.

Tabela 7. Taxa específica de crescimento (μ), concentração de biomassa máxima (X_{\max}) e Produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para as temperaturas de 27°C, 30°C e 33°C.

pH	μ (h^{-1})	X_{\max} ($g.L^{-1}$)	P_x ($g.L^{-1}.h^{-1}$)
4,5 (27°C)	0,08	4,39	0,06
4,5 (30°C)	0,09	4,47	0,06
4,5 (33°C)	0,08	3,42	0,04

A produtividade volumétrica de biomassa foi máxima à temperatura de 27°C e 30°C ($0,06g.L^{-1}.h^{-1}$) e mínima a 33°C ($0,04g.L^{-1}.h^{-1}$) (tabela 7). A maior concentração de biomassa máxima foi obtida a 30°C ($4,47g.L^{-1}$) e a menor a 33°C ($3,42g.L^{-1}$).

Na figura 9, estão representadas as curvas de pH para as temperaturas de 27°C, 30°C e 33°C.

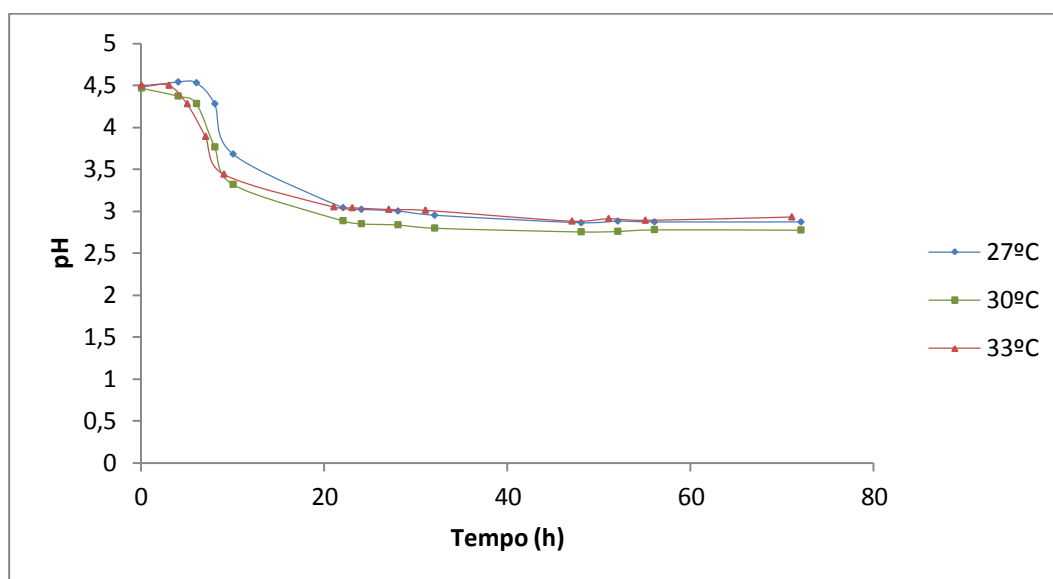


Figura 9. Variação do pH em função do tempo para cada temperatura.

Através do gráfico pode verificar-se uma descida acentuada do pH a partir do tempo $t=0h$. Por volta das 32h o pH começa a estabilizar até ao final do ensaio, 72h. A 27°C o pH final atingido foi de 2,87, a 30°C foi de 2,77 e a 33°C foi de 2,93. Observou-se que o pH final mais baixo que se atingiu (2,77) foi no ensaio onde se observou a taxa específica de crescimento e a concentração final de biomassa mais elevadas (30°C), o que pode ser explicado por uma maior produção de metabolitos ácidos resultantes da atividade metabólica.

Da análise da figura 10 verifica-se que em nenhum ensaio ocorreu o esgotamento da glucose. Para $t=0h$ a concentração inicial de glucose é de aproximadamente 30 g.L^{-1} para todas as temperaturas. Os valores de concentração de glucose residual no final do ensaio para todas as temperaturas foi praticamente o mesmo (para a temperatura de 27°C foi de $19,40 \text{ g.L}^{-1}$; a 30°C foi $20,88 \text{ g.L}^{-1}$ e a 33°C foi $19,97 \text{ g.L}^{-1}$).

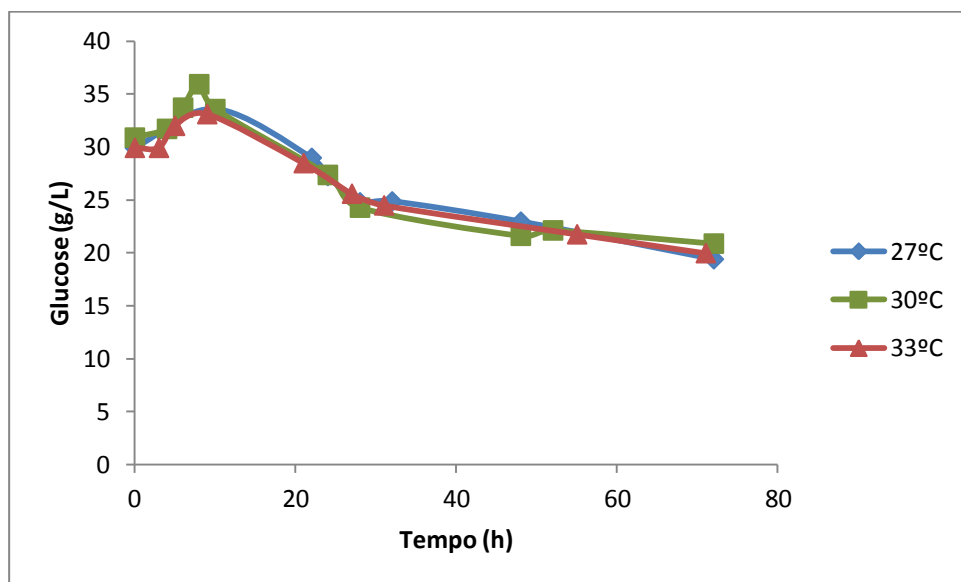


Figura 10. Concentração da glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para cada temperatura. [Os valores da concentração da glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% ($n=3$)].

A tabela 8 mostra o consumo de glucose bem como o rendimento de biomassa em relação á fonte de carbono e a taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose.

Tabela 8. Consumo de glucose, rendimento de biomassa em relação á fonte de carbono ($Y_{x/s}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de carbono (r_s) para cada temperatura. [Os valores da concentração de glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% ($n=3$)].

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Consumo de Glucose (g.L^{-1})	$Y_{x/s}$ (g.g^{-1})	r_s ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
27	10,53	0,41	0,15
30	10,01	0,42	0,14
33	9,95	0,31	0,14

O maior consumo de glucose verifica-se para a temperatura de 27°C (10,53 g.L⁻¹) com uma taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose de 0,15 g.L⁻¹.h⁻¹. A 30°C também se verifica um elevado consumo de glucose (10,01 g.L⁻¹) e o maior rendimento de biomassa em relação á fonte de carbono (0,42 g.g⁻¹).

A figura 11 representa as curvas da concentração de azoto para cada temperatura ao longo do tempo.

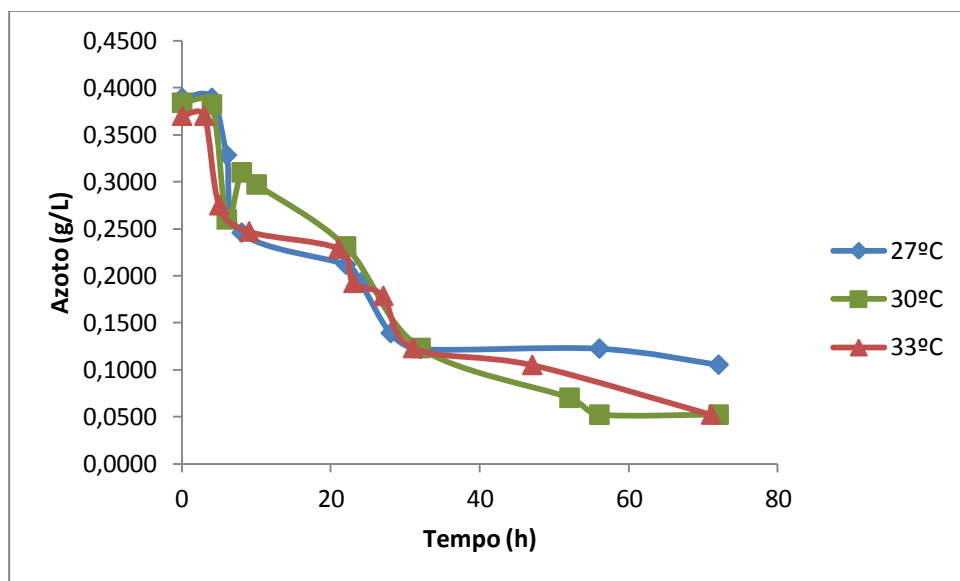


Figura 11. Evolução da concentração de azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada temperatura.

A concentração de azoto diminui ao longo do tempo. Todos os ensaios se iniciaram com uma concentração inicial de azoto de aproximadamente, 0,38 g.L⁻¹. No final dos ensaios a 30°C e 33°C os valores do azoto residual atingiram 0,05 g.L⁻¹, enquanto que a 27°C atingiu 0,11 g.L⁻¹. Em nenhum ensaio se verificou o esgotamento do azoto, embora os ensaios a 30°C e 33°C tivessem atingido valores de azoto residual mais baixos (0,05 g.L⁻¹). De acordo com a tabela 9, o maior consumo de azoto deu-se a 30°C com 0,33 g.L⁻¹. A taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto foi maior a 30°C (0,005 g.L⁻¹.h⁻¹). O rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto foi maior a 27°C (15,29 g.g⁻¹) e menor a 33°C (9,58 g.g⁻¹).

Tabela 9. Consumo de azoto, rendimento da biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada temperatura.

Temperatura (°C)	Consumo Azoto (g.L ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g.g ⁻¹)	r_N (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
27	0,28	15,29	0,004
30	0,33	12,60	0,005
33	0,32	9,58	0,004

2.2. Efeito da temperatura na produção de carotenóides

Na tabela 10 pode ver-se como variou a produção de carotenóides pela levedura *R. toruloides* com o aumento da temperatura.

Tabela 10. Efeito da temperatura na produção de carotenóides a pH 4,5, 150rpm.

T (°C)	CT (µg.g ⁻¹)	C CT (µg.L ⁻¹)	Pv CT (µg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y CT (µg.g ⁻¹)
27	10,58	45,89	0,64	4,36
30	63,02	263,31	3,66	26,29
33	29,99	91,32	1,29	9,17

A tabela 10 mostra que foi à temperatura de 30°C que se obteve o máximo de teor (63,02 µg.g⁻¹), concentração (263,31 µg.L⁻¹), produtividade (3,66 µg.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento (26,29 µg.g⁻¹) de carotenóides.

Estes resultados estão de acordo com Buzzini & Martini (1999), Aksu & Eren (2007), Latha *et al.* (2005), Zhang *et al.* (2014) e Malisorn & Suntornsuk (2008). Buzzini & Martini (1999) estudaram a temperatura na faixa dos 25°C a 35°C para a levedura *Rhodotorula glutinis* obtendo o máximo de concentração de carotenóides a 30°C, seguida de 35°C e 25°C, respetivamente. Latha *et al.* (2005) estudaram as temperaturas de 15°C, 29-32°C, 37°C e 42°C na levedura *R. glutinis* obtendo o máximo de concentração de carotenóides entre 29-32°C. Zhang *et al.* (2014) estudaram as temperaturas de 24°C e 30°C na levedura *R. glutinis* e o máximo de concentração de carotenóides também foi obtida para 30°C. Por seu lado, Malisorn & Suntornsuk (2008) afirmam que a temperaturas baixas e altas a biomassa e a produtividade em carotenóides diminui, o que está de acordo com os resultados obtidos. O fato da levedura crescer menos e produzir menos carotenóides a temperaturas mais altas pode estar relacionado com a desnaturação das enzimas

envolvidas na síntese de carotenóides, a essas temperaturas. Pelo contrário, a temperaturas mais baixas (30°C) as enzimas envolvidas na biossíntese de carotenóides são estimuladas (Zhang *et al.* (2014)).

2.3. Efeito da temperatura na produção de ácidos gordos

A tabela 11 mostra que é também a 30°C que a levedura produz mais AGT. Os resultados obtidos mostram que foi a 30°C que se obteve o maior teor (17,98% p/p), concentração (0,75 g.L⁻¹) e rendimento (0,08 g.g⁻¹) em AG. De facto, a esta temperatura, verificou-se um elevado consumo de glucose e de azoto como referido anteriormente, o que poderá justificar a elevada produção de ácidos gordos e carotenóides pela levedura.

Tabela 11. Efeito da temperatura na produção de ácidos gordos a pH 4,5, 150rpm. [Os valores dos AGT foram obtidos a partir de dois replicados independentes com um desvio-padrão que não excedeu 10% (n=2)].

T (°C)	AG (%p/p)	C AGT (g.L ⁻¹)	Pv AGT (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y AGT (g.g ⁻¹)
27	16,06	0,70	0,01	0,07
30	17,98	0,75	0,01	0,08
33	16,78	0,51	0,01	0,05

Saxena *et al.* (1998) estudaram a levedura *Rhodotorula minuta* em fermentador com a finalidade de investigar o crescimento e acumulação de lípidos. A fermentação foi mantida a pH 4,5, agitação 600 rpm, aeração 1vvm e fizeram variar as temperaturas de 30°C a 38°C para a produção de ácidos gordos tendo obtido o máximo a 32°C. Segundo Zhang *et al.* (2014) o máximo teor lipídico foi obtido a temperatura baixa de 24°C (38,8%p/p) num meio que continha glucose sendo que o microrganismo em estudo foi *R. glutinis*. O estudo decorreu em frascos agitados a 180 rpm durante 40h e as temperaturas estudadas foram 24°C e 30°C. Fei *et al.* (2011) estudaram a levedura *C. albidus var. albidus* (ATCC 10672) em frascos agitados, num meio que continha ácidos gordos voláteis, pH 6,0, 150 rpm cultivado durante 96 h, sendo que o máximo de concentração de lípidos se deu a 25°C (0,3 g.L⁻¹) o que é contrário aos resultados obtidos. Contudo, os resultados obtidos neste trabalho seguem a mesma tendência que os resultados descritos no trabalho destes autores, que mostra que as temperaturas altas (acima de 34°C) são desfavoráveis para a biossíntese de ácidos gordos.

Para todas as temperaturas obteve-se a mesma produtividade volumétrica em ácidos gordos (0,01g.L⁻¹.h⁻¹).

2.3.1. Efeito da temperatura na composição dos ácidos gordos

A tabela 12 apresenta os valores, em percentagem (p/p), da composição em ácidos gordos da biomassa da levedura *R. toruloides* ao fim de, aproximadamente, 72h de crescimento. Como se pode ver na tabela a 30°C, os ácidos gordos maioritários são o ácido oleico (C18:1 ω 9) e o ácido linoleico (C18:2 ω 6). Estes resultados estão de acordo com Saxena *et al.* (1998) que em fermentador também obtiveram para *Rhodotorula minuta* os mesmos ácidos gordos maioritários embora não pela mesma ordem (18:1; 16:0; 18:2; 12:0; 14:0 e 18:0). Os ácidos gordos maioritários foram os monoinsaturados (MIS) numa proporção em cerca de 40% p/p. Os ácidos gordos saturados (SAT) variaram entre 28,95% p/p e 43,09% p/p sendo este último, o valor mais alto atingido para a temperatura mais alta estudada de 33°C. Os ácidos gordos polinsaturados (PIS) variaram entre 18,49% p/p e 28,18% p/p sendo este último, o valor mais alto obtido para a temperatura mais baixa estudada de 27°C.

Tabela 12. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para as temperaturas 27°C, 30°C e 33°C.

Ácidos Gordos Perfil	27°C	30°C	33°C
16:0	14,49 \pm 0,14	14,15 \pm 0,14	14,10 \pm 0,03
18:0	11,96 \pm 0,10	18,73 \pm 0,24	22,66 \pm 0,07
18:1 ω 9	42,87 \pm 0,01	41,41 \pm 0,21	38,42 \pm 0,02
18:2 ω 6	24,59 \pm 0,17	18,75 \pm 0,27	16,31 \pm 0,09
18:3 ω 3	3,59 \pm 0,07	2,47 \pm 0,06	2,18 \pm 0,00
22:0	-	0,70 \pm 0,99	1,89 \pm 0,01
24:0	2,50 \pm 0,01	3,78 \pm 0,07	4,44 \pm 0,03
SATURADOS (SAT)	28,95	37,36	43,09
MONOINSATURADOS (MIS)	42,87	41,41	38,42
POLINSATURADOS (PIS)	28,18	21,22	18,49

O ácido palmítico (C16:0) diminuiu com o aumento da temperatura. O mesmo se verificou para o ácido oleico (C18:1 ω 9), o ácido linoleico (C18:2 ω 6) e o ácido linolénico (C18:3 ω 3).

O ácido esteárico (C18:0) e lignocérico (C24:0) aumentaram com o aumento da temperatura.

O ácido behénico (C22:0) não apareceu a 27°C surgindo a 30°C e 33°C.

Estes resultados também estão de acordo com os mesmos autores quando afirmam que a percentagem de ácidos gordos insaturados diminui com o aumento da temperatura. Como referido anteriormente, verifica-se um aumento dos ácidos gordos saturados e uma diminuição dos ácidos gordos insaturados com a temperatura. Isto deve-se à capacidade que as células têm de se adaptar ao ambiente, ajustando a composição dos ácidos gordos de membrana à temperatura em que se desenvolvem. Assim, a temperaturas mais baixas, as células produzem mais AG insaturados para compensar a perda de fluidez da membrana induzida pelo abaixamento da temperatura, produzindo maior percentagem de ácidos gordos saturados (que apresentam ponto de fusão mais elevado que os AG MIS e PIS) quando crescem a temperaturas mais altas para compensar o aumento de fluidez das membranas celulares que ocorre a essas temperaturas (Suutari *et al.* (1991)).

3. Efeito da agitação no crescimento e produção de carotenóides e ácidos gordos pela levedura *R. toruloides* NCYC 921

3.1. Efeito da agitação no crescimento da levedura *R. toruloides*

A velocidade de agitação que determina a disponibilidade de oxigénio no meio de cultura é um parâmetro que influencia a produção de biomassa, de lípidos e de carotenóides (Hernández-Almanza *et al.* (2014)).

A figura 12 apresenta as curvas de crescimento para *R. toruloides* relativas à agitação do meio. Pode verificar-se que a agitação que induziu a máxima concentração de biomassa foi a agitação de 120 rpm.

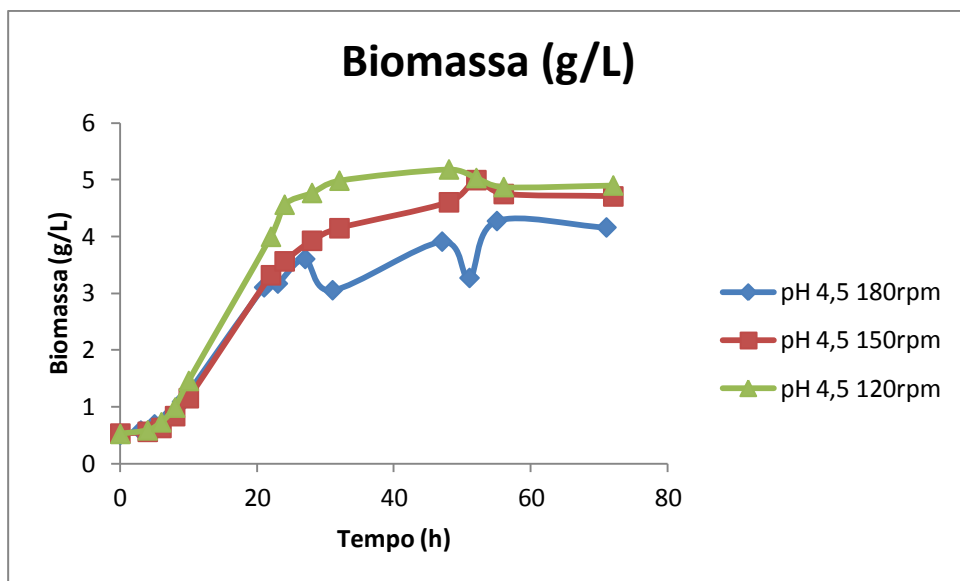


Figura 12. Evolução da concentração de biomassa (g/L) em função do tempo (h) referente ao crescimento da levedura *R. toruloides* para cada agitação, em frascos agitados. [Os valores de biomassa corresponde, à média das leituras de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

Aumentando a velocidade de agitação da cultura em frascos agitados, aumenta a turbulência do meio, o que por sua vez aumenta a taxa de transferência de oxigênio.

Segundo os trabalhos de Aksu & Eren (2007), Choi *et al.* (1982), Yen & Zhang (2011) e Cutzu *et al.* (2013) o aumento na taxa de transferência de oxigênio é favorável à produção de biomassa das leveduras *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula glutinis* respetivamente, o que é contrário aos resultados obtidos (figura 13).

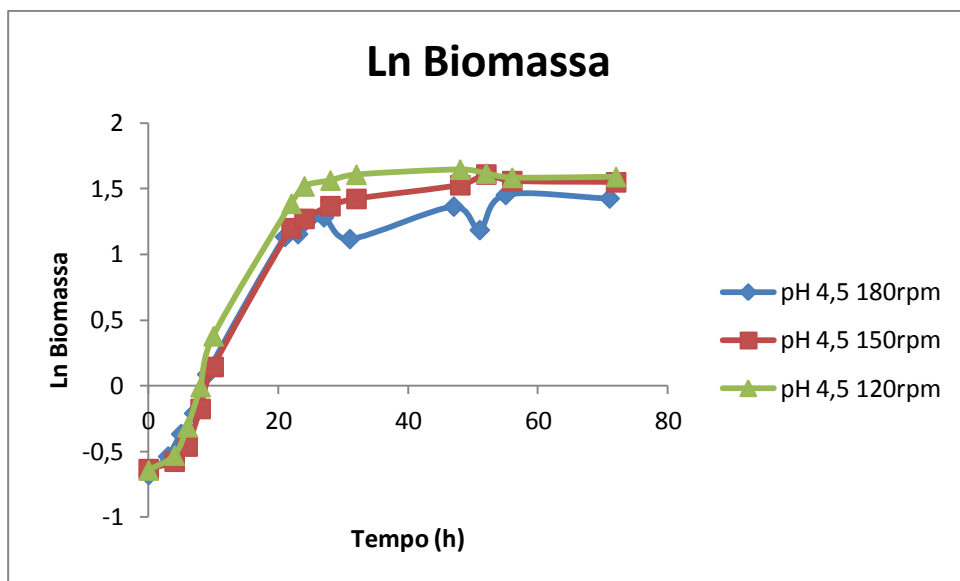


Figura 13. Curvas de crescimento de *R. toruloides* a 120, 150 e 180 rpm.

No que se refere ao crescimento da levedura *R. toruloides* (Figura 13), a 120 rpm das 0 h às 4 h a levedura ainda está em fase de latência. Inicia a sua duplicação às 6 h duplicando até às 24 h e atingindo a concentração de biomassa máxima de $5,18 \text{ g.L}^{-1}$ às 48 h. A fase estacionária deu-se das 24 h às 72 h. A 150 rpm, a levedura entrou em fase de latência até às 4 h. A partir das 6 h iniciou a sua duplicação até às 24 h e a máxima concentração de biomassa foi atingida às 52 h no valor de $5,00 \text{ g.L}^{-1}$. A 180 rpm a fase de latência é curta entrando rapidamente em fase de duplicação ao fim de 3 h até às 23 h. Às 55 h obteve-se a concentração de biomassa máxima de $4,27 \text{ g.L}^{-1}$.

Os resultados indicam que a 120 rpm, ou seja, a uma menor velocidade de agitação, a taxa específica de crescimento é maior, atingindo $0,10 \text{ h}^{-1}$. A uma taxa de agitação maior a taxa específica de crescimento é menor: $0,09 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 13).

Tabela 13. Taxa específica de crescimento (μ), concentração de biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) e Produtividade volumétrica da biomassa (P_x) para a velocidade de agitação de 120, 150 e 180 rpm.

pH	$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$X_{\text{máx}} \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	$P_x \text{ (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$
4,5 (120rpm)	0,10	4,66	0,06
4,5 (150rpm)	0,09	4,47	0,06
4,5 (180rpm)	0,09	3,77	0,05

Cutzu *et al.* (2013) verificaram que, para o mutante 400A15 da estirpe *Rhodotorula glutinis* também desenvolvido em frascos agitados, o aumento da transferência de oxigênio diminuía a concentração de biomassa quando a razão carbono/azoto do meio de cultura atingia 65, porque, a essa razão, o azoto limitava o crescimento da levedura. Neste trabalho a relação carbono/azoto do meio de cultura utilizado foi de, 78 (não considerando o carbono e o azoto presente em 0,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura).

A produtividade volumétrica máxima deu-se a 120 e 150 rpm (0,06 g.L⁻¹.h⁻¹) enquanto a produtividade volumétrica mínima deu-se a 180 rpm (0,05 g.L⁻¹.h⁻¹) (Tabela 13). O maior valor de concentração de biomassa máxima foi obtida a 120 rpm (4,66 g.L⁻¹) e o menor a 180 rpm (3,77 g.L⁻¹).

A figura 14 ilustra como variou o pH ao longo do tempo com a agitação.

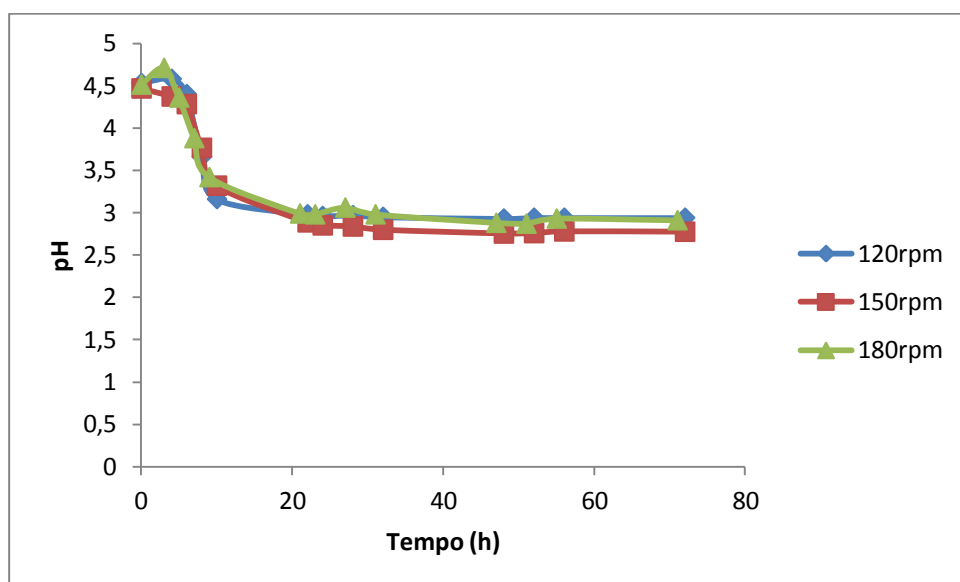


Figura 14. Variação do pH em função do tempo para cada agitação.

Como se pode observar na figura 14, o pH decresceu até aproximadamente às 32 h e estabilizou até ao final do ensaio, ao fim de aproximadamente 72h. O mais baixo pH atingido foi a 150 rpm com 2,774. Para a agitação de 120 rpm foi 2,94 e para 180 rpm foi 2,91.

Em relação ao consumo de glucose pode observar-se que a 120 rpm e 150 rpm há um decréscimo mais acentuado do consumo da glucose ao longo do tempo, comparativamente a 180 rpm (Figura 15).

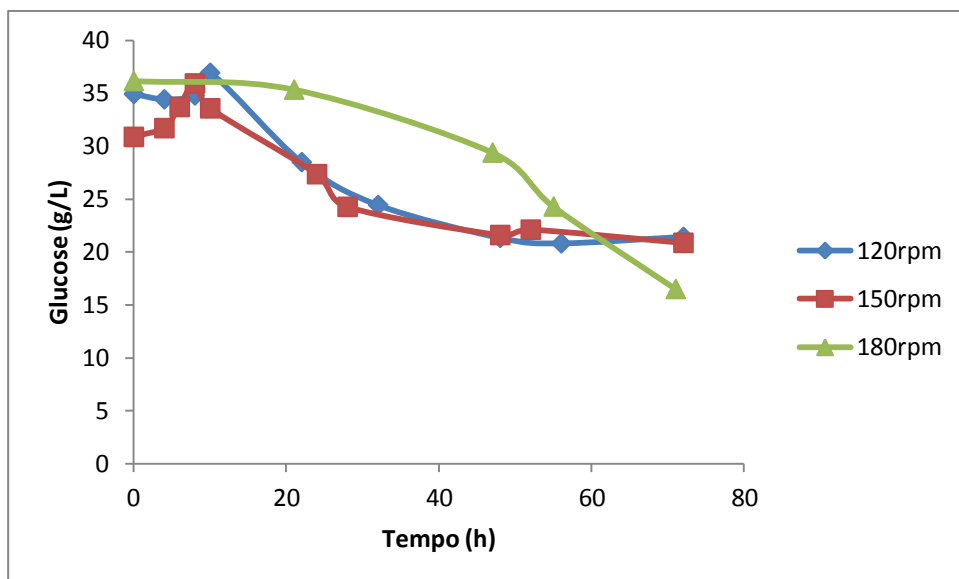


Figura 15. Concentração de glucose residual (g/L) *versus* tempo (h) para cada agitação. [Os valores da concentração da glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

Em nenhum dos ensaios ocorreu esgotamento da glucose. Ao fim de 72 h a concentração de glucose residual no meio era de 21,44 g.L⁻¹ e 20,88 g.L⁻¹ para a agitação de 120 rpm e 150 rpm, respetivamente. Ao fim de 71 h era de 16,52 g.L⁻¹ para 180 rpm.

Tabela 14. Consumo de glucose, rendimento de biomassa em relação à fonte de carbono ($Y_{x/s}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de glucose (r_s) para cada agitação. [Os valores da concentração de glucose foram obtidos a partir de triplicados, com um desvio-padrão que não ultrapassou 10% (n=3)].

Agitação (rpm)	Consumo de Glucose (g.L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)	r_s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
120	13,51	0,32	0,19
150	10,01	0,42	0,14
180	19,66	0,19	0,28

A tabela 14 indica que à taxa de agitação de 180 rpm houve um maior consumo de glucose (19,66 g.L⁻¹) e que a taxa volumétrica de consumo de fonte de carbono foi superior (0,28 g.L⁻¹.h⁻¹) para essa agitação.

O maior rendimento de biomassa em relação á fonte de carbono verificou-se à agitação de 150 rpm (0,42 g.g⁻¹).

Na figura 16, estão representadas as curvas de azoto para cada agitação. A 120 rpm e 150 rpm ao fim das 72 h obtiveram-se os valores de 0,09 g.L⁻¹ e 0,05 g.L⁻¹ respetivamente. Ao fim de 71 h para a agitação de 180 rpm obteve-se 0 g.L⁻¹.

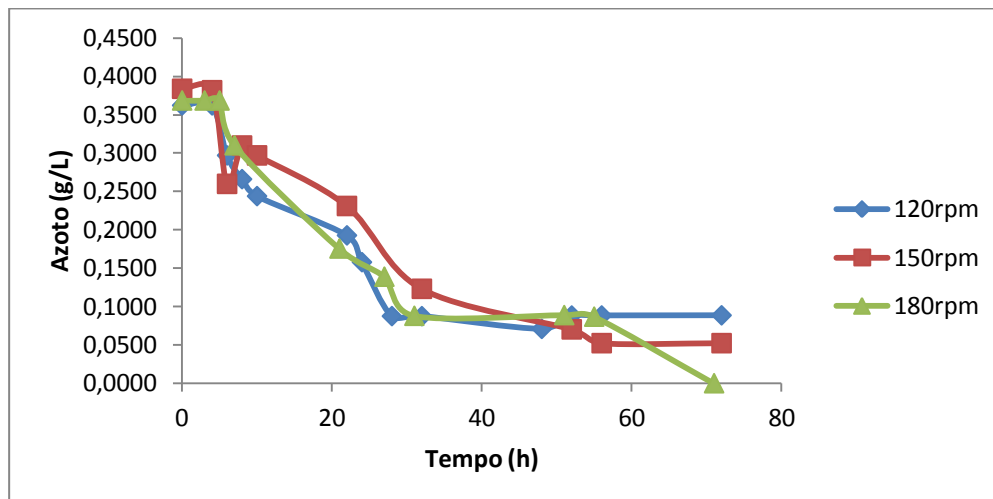


Figura 16. Evolução da concentração de azoto (g/L) em função do tempo (h) para cada agitação.

Pode verificar-se que a 180rpm houve um esgotamento do azoto podendo significar que o azoto limitou o crescimento da levedura, uma vez que, também a 180 rpm se verificou um menor crescimento. Este facto explica a baixa concentração de biomassa que as células produziram neste ensaio, uma vez que, sem azoto, as células não conseguem sintetizar de novo proteínas, essenciais na multiplicação celular. Nos ensaios realizados a 120 rpm e 150 rpm, uma vez que, a glucose e o azoto não esgotaram, é provável que o crescimento tenha sido limitado por uma insuficiente disponibilidade em oxigénio. Esta suposição é suportada pelo facto dos consumos em glucose e azoto terem sido superiores no ensaio a 180 rpm, em relação aos ensaios realizados a 120 rpm e 150 rpm (Tabelas 14 e 15).

Tabela 15. Consumo de azoto, rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto ($Y_{X/N}$) e taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto (r_N) para cada agitação.

Agitação (rpm)	Consumo Azoto (g.L ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g.g ⁻¹)	r_N (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
120	0,27	15,99	0,004
150	0,33	12,60	0,005
180	0,37	9,92	0,005

A taxa volumétrica de consumo de fonte de azoto foi maior para as agitações de 150 rpm e 180 rpm ($0,005 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e menor para a agitação de 120 rpm ($0,004 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Tabela 15). O rendimento de biomassa em relação à fonte de azoto foi maior a 120 rpm ($15,99 \text{ g.g}^{-1}$) e menor a 180 rpm ($9,92 \text{ g.g}^{-1}$), o que é expectável, uma vez que, a cultura atingiu maior concentração de biomassa e consumiu menos azoto de 120 rpm, verificando-se o oposto para a cultura desenvolvida a 180 rpm.

3.2. Efeito da agitação na produção de carotenóides

Aksu & Eren (2007) estudaram o efeito da aeração na produção de carotenóides e concluíram que o aumento da aeração era benéfico tanto para a concentração de biomassa, como de carotenóides, obtendo valores muito elevados para maiores taxas de aeração.

Os resultados indicam que no ensaio conduzido a 150 rpm obteve-se o maior teor em carotenóides ($63,02 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) (Tabela 16), valor muito mais alto que a 120 rpm ($12,24 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$) e 180 rpm ($16,77 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$). Cutzu *et al.* (2013) verificaram que, para a razão C/N de 65, a concentração de β -caroteno atingia o máximo teor a baixa taxa de transferência de oxigénio, contrariamente ao que se observou neste ensaio, em que houve um aumento do teor de carotenóides totais nas células, quando se aumentou a agitação de 120 rpm para 150 rpm.

Tabela 16. Influência da velocidade de agitação (rpm) na produção de carotenóides de *R. toruloides* a pH 4,5, 30°C.

rpm	CT ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	C CT ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Pv CT ($\mu\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Y CT ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
120	12,24	53,56	0,74	3,96
150	63,02	263,31	3,66	26,29
180	16,77	61,31	0,86	3,12

3.3. Efeito da agitação na produção de ácidos gordos

Analisando a influência que a agitação tem na acumulação de lípidos por *R. toruloides*, pode observar-se, na tabela 17, que o máximo teor (19,85 % p/p) bem como a máxima concentração ($0,87 \text{ g.L}^{-1}$) foram obtidos para a agitação de 120 rpm, o que significa, que a acumulação de lípidos foi favorecida quando o oxigénio dissolvido foi menor, tal como se observou para a produção de biomassa da levedura. Contrariamente, quando o oxigénio dissolvido foi maior, isto é, para maiores velocidades de agitação (180 rpm) foi obtido o menor teor de ácidos gordos (16,45 % p/p) e menor concentração de ácidos gordos ($0,60 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 17. Influência da velocidade de agitação (rpm) na produção de ácidos gordos de *R. toruloides* a pH 4,5, 30°C.

rpm	AG (%p/p)	C AGT (g.L ⁻¹)	Pv AGT (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y AGT (g.g ⁻¹)
120	19,85	0,87	0,01	0,06
150	17,98	0,75	0,01	0,08
180	16,45	0,60	0,01	0,03

Estes resultados estão de acordo com Yen & Zhang (2011). O microrganismo em estudo foi a estirpe *R. glutinis* BCRC 22360. Para avaliar o efeito do oxigénio dissolvido sobre a acumulação de lípidos, fizeram variar o volume do meio de cultivo (30, 40 e 50 mL) e a velocidade de agitação (60, 150 e 210 rpm com 50 mL de meio de cultivo). A experiência decorreu à temperatura de 24°C num meio que continha glucose, melaço, glicerol e amido solúvel. Relativamente à variação do volume de cultivo concluíram que, com o aumento do volume de cultivo o teor lipídico aumentava (atingindo, aproximadamente, 20% p/p em relação à biomassa). Relativamente à velocidade de agitação, concluíram que uma baixa agitação fazia aumentar o teor lipídico (atingindo, aproximadamente, 28% p/p em relação à biomassa). Estes resultados são concordantes pois, um maior volume de meio e uma baixa agitação implicam uma baixa disponibilidade de oxigénio.

No estudo efetuado por Choi *et al.* (1982) a estirpe utilizada foi *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091. As condições operacionais foram as seguintes: temperatura 30±0,5°C; pH 5,5±0,1; taxa de aeração 1vvm e agitação 500-600rpm em fermentador. Contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, os resultados de Choi *et al.* (1982) demonstraram que o teor lipídico aumentava com o aumento do oxigénio dissolvido.

Na tabela 17, também estão representadas a produtividades e rendimentos dos ácidos gordos. Através da tabela pode concluir-se que a produtividade foi a mesma para todas as velocidades de agitação (0,01 g.L⁻¹.h⁻¹). O rendimento de ácidos gordos foi maior para a agitação de 150 rpm (0,08 g.g⁻¹) e menor para a agitação de 180 rpm (0,03 g.g⁻¹).

3.3.1. Efeito da agitação na composição dos ácidos gordos

A tabela 18 ilustra como varia a composição dos ácidos gordos com a agitação. Através da tabela pode verificar-se um aumento dos ácidos gordos polinsaturados (ácido linoleico (18:2 ω6) e ácido linolénico (18:3 ω3)) com o aumento da agitação. Contrariamente, os ácidos gordos saturados e monoinsaturados (ácido esteárico (C18:0), ácido lignocérico (C24:0) e ácido oléico (C18:1 ω9)) diminuem com o aumento da agitação.

Daqui pode concluir-se, que a elevada disponibilidade de oxigénio favorece os ácidos gordos polinsaturados. Efetivamente, as enzimas dessaturases, envolvidas na síntese de ácidos gordos polinsaturados, são afetadas pela presença do oxigénio molecular, sendo este nutriente essencial para a sua atividade (Choi *et al.* (1982)).

Tabela 18. Perfil dos ácidos gordos (%p/p) para as agitações de 120rpm, 150rpm e 180rpm.

Ácidos Gordos Perfil	120rpm	150rpm	180rpm
16:0	13,32±0,01	14,15±0,14	14,27±0,01
18:0	20,36±0,05	18,73±0,24	18,54±0,00
18:1 ω9	44,75±0,05	41,41±0,21	38,85±0,06
18:2 ω6	16,22±0,09	18,75±0,27	21,86±0,14
18:3 ω3	1,89±0,03	2,47±0,06	3,10±0,01
22:0	-	0,70±0,99	-
24:0	3,47±0,04	3,78±0,07	3,37±0,09
SATURADOS (SAT)	37,15	37,36	36,18
MONOINSATURADOS (MIS)	44,75	41,41	38,85
POLINSATURADOS (PIS)	18,11	21,22	24,96

Resultados idênticos foram obtidos por Duarte *et al.* (2014) e Choi *et al.* (1982). Duarte *et al.* (2014) fizeram um estudo sobre o efeito da agitação e aeração na composição dos lípidos em fermentador para a levedura *Candida* sp. LEB-M3 em meio com glicerol. O cultivo decorreu em fermentador de 1,5 L com 1,2 L de volume de meio para as agitações de 200 rpm, 300 rpm e 400 rpm e aeração 0,5 vvm, 0,75 vvm e 1,0 vvm à temperatura de 28°C durante 240 h. Estes autores verificaram que uma baixa agitação (200 rpm) e aeração (0,5 vvm) implicava menos oxigénio dissolvido no meio, o que favorecia a formação de ácidos gordos saturados. Contrariamente, uma baixa agitação e aeração diminuía a formação de ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados.

Choi *et al.* (1982) estudaram a estirpe *Rhodotorula gracilis* NRRL Y-1091 nas condições operacionais referidas anteriormente. Comparativamente aos resultados correntes, também obtiveram um aumento do ácido palmítico (C16:0) com o aumento da concentração de oxigénio dissolvido. Os ácidos esteárico e oleico (saturados e monoinsaturados) diminuíram com o aumento da concentração de oxigénio dissolvido e os

ácidos linoleico e linolénico (polinsaturados) aumentaram com o aumento da concentração de oxigénio dissolvido. Com base nestes resultados, é conclusivo que um aumento da disponibilidade de oxigénio favorece a formação de ácidos gordos polinsaturados.

CONCLUSÃO

Com este trabalho pretendeu-se otimizar as condições de cultivo da levedura *Rhodospiridium toruloides* de forma a maximizar a produção de lípidos e carotenóides pela levedura. Foram estudados três condições operacionais que condicionam o crescimento da levedura e a sua produção de ácidos gordos e carotenóides: o pH, a temperatura e a agitação.

Com este estudo, obteve-se máxima produtividade de carotenóides a pH 4,5, temperatura 30°C e agitação 150 rpm. Considerou-se prioritária a maximização da produção de carotenóides, porque estes são um produto de alto valor acrescentado, podendo ser comercializados em indústrias farmacêutica e alimentar. A máxima produção de lípidos foi obtida a pH 4,0, temperatura de 30°C e agitação 120 rpm. A maximização da produtividade de lípidos também é importante pois é possível obter biodiesel a partir dos ácidos gordos da levedura através de uma reação de transesterificação daqueles compostos. A máxima produtividade em biomassa foi obtida a pH 4,0, temperatura 27°C e 30°C e agitação 120 rpm e 150 rpm.

A co-produção de carotenóides e ácidos gordos a partir da levedura permitirá aproveitar e valorizar, em simultâneo, estes produtos da biomassa microbiana, o que poderá contribuir para tornar o processo de produção do biodiesel economicamente viável.

Para tornar o biodiesel ainda mais rentável poder-se-ia substituir a fonte de carbono do meio (glucose) por outra de mais baixo custo, estando em curso estes estudos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] BAGY, M. M. K.; ABD-ALLA, M. H.; MORSY, F.M.; HASSAN, E. A. (2014) – Two Stage biodiesel and hydrogen production from molasses by oleaginous fungi and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *International Journal of HYDROGEN ENERGY*, **39**: 3185-3197.
- [2] SALVI, B. L.; PANWAR, N. L. (2012) – Biodiesel resources and production technologies – A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**: 3680-3689.
- [3] SRIRANGAN, K.; AKAWI, L.; MOO-YOUNG, M.; CHOU, C. P. (2012) – Towards sustainable production of clean energy carriers from biomass resources. *Applied Energy*, **100**: 172-186.
- [4] BERGMANN, J. C.; TUPINAMBÁ, D. D.; COSTA, O. Y. A.; ALMEIDA, J. R. M.; BARRETO, C. C.; QUIRINO, B. F. (2013) – Biodiesel production in Brazil and alternative biomass feedstocks. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **21**: 411-420.
- [5] LI, Q.; DU, W.; LIU, D. (2008) – Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **80**: 749-756.
- [6] RAWAT, I.; KUMAR, R. R.; MUTANDA, T.; BUX, F. (2013) – Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, **103**: 444-467.
- [7] MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. (2009) – Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, **34**: 1-5.
- [8] HEERES, A. S.; PICONE, C. S. F.; VAN DER WIELEN, L. A.M.; CUNHA, R. L.; CUELLAR, M. C. (2014) – Microbial advanced biofuels production: overcoming emulsification challenges for large-scale operation. *Trends in Biotechnology*, **32** (4): 221-229.
- [9] Rossi, M., Amaretti, A., Raimondi, S. & Leonardi, A. – *Getting Lipids for Biodiesel Production from Oleaginous Fungi*. University of Modena and Reggio Emilia, Italy.
- [10] FEI, Q.; CHANG, H. N.; SHANG, L.; CHOI, J.; KIM, N.; KANG, J. (2011) – The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, **102**: 2696-2701.
- [11] FREITAS, C.; NOBRE, B.; GOUVEIA, L.; ROSEIRO, J.; REIS, A. (2014) – New at-line cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921 batch growth. *Process Biochemistry*, **49**: 554-562.

- [12] ANDRADE, R. C. R. (2010) – *Estudo do desenvolvimento e da produtividade lipídica da levedura Rhodotorula glutinis NCYC 921 em culturas descontínuas monitorizadas por citometria de fluxo*, Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, Monte da Caparica, Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 47p.
- [13] YOON, S. H.; RHEE, J. S. (1983) – Lipid from Yeast Fermentation: Effects of Cultural Conditions on Lipid Production and Its Characteristics of *Rhodotorula glutinis*. *JAOCS*, **60** (7): 1281-1286.
- [14] JANUÁRIO, T. M. P. (2014) - *Otimização do processo de produção de lípidos e carotenóides a partir da biomassa da levedura Rhodotorula glutinis NRRL Y-1091*, Dissertação para o grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 68p.
- [15] KNOP, M. (2011) – Yeast cell morphology and sexual reproduction – A short overview and some considerations. *C. R. Biologies*, **334**: 599-606.
- [16] Adams, M. R. & Moss, M. O. (1995) – *Food Microbiology*, Cambridge UK, The Royal Society of Chemistry, 398pp.
- [17] Stanbury, P. F. & Whitaker, A. (1984) – *Principles of Fermentation Technology*, England UK, Pergamon Press, 255pp.
- [18] LOPES DA SILVA, T.; GOUVEIA, L.; REIS, A. (2013) – Integrated microbial processes for biofuels and high value-added products: the way to improve the cost effectiveness of biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol*,
- [19] Ribeiro, E. P. & Seratalli, E. A. G. (2007) – *Química de Alimentos*, São Paulo, Editora Edgard Blucher Ltda, 184pp.
- [20] Karleskind, A. (1992) – *Manuel des Corps Gras*, Paris, Lavoisier TEC & DOC, 787pp.
- [21] FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. (2009) – Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **36**: 163-180.
- [22] YAHIA, E. M.; ORNELAS-PAZ, J. – Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. 177-186.
- [23] SAXENA, V.; SHARMA, C. D.; BHAGAT, S. D.; SAINI, V. S.; ADHIKARI, D., K. (1998) – Lipid and Fatty Acid Biosynthesis by *Rhodotorula minuta*. *JAOCS*, **75** (4): 501-505.

- [24] DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; STRUB, C.; SCHORR-GALINDO, S. (2014) – Single cell oils (SCOs) from oleaginous yeasts and moulds: Production and genetics. *Biomass and Bioenergy*, **68**: 135-150.
- [25] ZHANG, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. (2014) – Lipid and carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* under irradiation/high-temperature and dark-low-temperature cultivation. *Bioresource Technology*, **157**: 140-153.
- [26] XUE, F.; ZHANG, X.; LUO, H.; TAN, T. (2006) – A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, **41**: 1699-1702.
- [27] KARATAY, S. E.; DÖNMEZ, G. (2010) – Improving the lipid accumulation properties of the yeast cells for biodiesel production using molasses. *Bioresource Technology*, **101**: 7988-7990.
- [28] CHOI, S. Y.; DEWEY, D. Y.; RHEE, J. S. (1982) – Production of Microbial Lipid: Effects of Growth Rate and Oxygen of Lipid Synthesis and Fatty Acid Composition of *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, **XXIV**: 1165-1172.
- [29] YEN, H.; ZHANG, Z. (2011) – Effects of dissolved oxygen level on cell growth and total lipid accumulation in the cultivation of *Rhodotoula glutinis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112** (1): 71-74.
- [30] AKSU, Z.; EREN, A. T. (2007) – Production of carotenóides by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, **35**: 107-113.
- [31] BUZZINI, P.; MARTINI, A. (1999) – Production of carotenóides by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. *Bioresource Technology*, **71**: 41-44.
- [32] LATHA, B. V.; JEEVARATNAM, K.; MURALI, H. S.; MANJA, K. S. (2005) – Influence of growth factors on carotenoid pigmentation of *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY from natural source. *Indian Journal of Biotechnology*, **4**: 353-357.
- [33] LUO, H.; NIU, Y.; DUAN, C.; SU, H.; YAN, G. (2013) – A pH control strategy for increased β -carotene production during batch fermentation by recombinant industrial wine yeast. *Process Biochemistry*, **48**: 195-200.
- [34] CUTZU, R.; CLEMENTE, A.; REIS, A.; NOBRE, B.; MANNAZZU, I.; ROSEIRO, J.; LOPES DA SILVA, T. (2013) – Assessment of β -carotene content, cell physiology and morphology of the yellow yeast *Rhodotorula glutinis* mutante 400A15 using flow cytometry. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **40**: 865-875.

- [35] LEPAGE, G.; ROY, C. (1986) – Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, **27**: 114-119.
- [36] HERNÁNDEZ-ALMANZA, A.; MONTANEZ, J. C.; AGUILAR-GONZÁLEZ, M. A.; MARTÍNEZ-ÁVILA, C.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R.; AGUILAR, C. N. (2014) – *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, **5**: 64-72.
- [37] MALISORN, C.; SUNTORNSUK, W. (2008) – Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, **99**: 2281-2287.
- [38] SUUTARI, M.; LIUKKONEN, K.; LAAKSO, S. (1990) – Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *Journal of General Microbiology*, **136**: 1469-1474.
- [39] Harper, H. A., Rodwell, V.W. & Mayes, P. A. (1982). *Manual de Química Fisiológica*, 5ª Edição, São Paulo, ATHENEU EDITORA SÃO PAULO LTDA., 736pp.
- [40] DYAL, S. D.; NARINE, S. S. (2005) – Implications for the use of *Mortierella* fungi in the industrial production of essential fatty acids. *Food Research International*, **38**: 445-467.
- [41] DUARTE, S. H.; ANSOLIN M.; MAUGERI F. (2014) – Cultivation of *Candida* sp. LEB-M3 in glycerol: Lipid accumulation and prediction of biodiesel quality parameters. *Bioresource Technology*, **161**: 416-422.
- [42] TACCARI, M.; CANONICO L.; COMITINI F.; MANNAZZU I.; CIANI M. (2012) – Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. *Bioresource Technology*, **110**: 488-495.
- [43] PAN, J. G.; KWAK, M. Y.; RHEE, J. S. (1986) – High density cell culture of *Rhodotorula glutinis* using oxygen-enriched air. *Biotechnology Letters*, **8** (10): 715-718.
- [44] TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. (2005) – Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, **40**: 2551-2557.

Anexo I
Reagentes

Tabela 19. Lista de Reagentes.

Nome do Reagente	Fórmula Química	Marca
Reagentes utilizados no meio de cultivo		
Cloreto de cálcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	E. Merk Germany
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	José M. Vaz Pereira, S.A.
Hidrogenofosfato de di-sódio anidro	Na_2HPO_4	Panrec Química SAU
Di-hidrogenofosfato de Potássio	KH_2PO_4	Panrec Química SAU
Extrato de Levedura	-	Cultimed
Ureia	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	Sigma Chemical CO
Reagentes utilizados no Doseamento de Açúcares Redutores		
Glucose Anidra	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	Fisher Scientific UK
Ácido Dinitrosalicílico	-	-
Reagentes utilizados na Transmutação de Ácidos Gordos		
Metanol	CH_3OH	E. Merk Germany
Cloreto de Acetilo	$\text{C}_2\text{H}_3\text{ClO}$	Panrec Química SAU
n-heptano	C_7H_{16}	E. Merk Germany
Sulfato de Sódio Anidro	Na_2SO_4	E. Merk Germany
Reagentes utilizados na determinação de Azotos		
Ácido Sulfúrico 96%	H_2SO_4	E. Merk Germany
Ácido Bórico 4%	H_3BO_4	E. Merk Germany
Sulfato de Cobre 3%	CuSO_4	E. Merk Germany
Óxido de Titânio 3%	TiO_2	E. Merk Germany
Ácido Esteárico 1%	$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$	E. Merk Germany
Sulfato de Potássio 93%	K_2SO_4	E. Merk Germany